

Vonalpásztázáson alapuló tomográfiás optikai mikroszkóp elméleti és kísérleti vizsgálata

PhD-értekezés

Szerző:
Gajdáty Gábor

Témavezetők:
Dr. Erdélyi Miklós és Prof. Dr. Szabó Gábor

Fizika Doktori Iskola
Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék
Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

2010
Szeged

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés.....	4
2. Tudományos háttér	7
2.1 Képkalkáló rendszerek feloldóképessége	7
2.2 Pásztázó konfokális mikroszkóp	9
2.3 Optical Projection Tomography képkalkáló eljárás	12
2.4 Képrekonstruáló algoritmusok	13
2.4.1 Visszavetítés.....	15
2.4.2 Fourier rekonstrukció.....	16
2.4.3 Szűrt-visszavetítés.....	17
2.4.4 DIRECTT eljárás.....	18
2.5 Anizotrop kristályok, kettőtörés.....	19
2.5.1 Optikai anizotropia.....	20
2.5.2 Egytengelyű kristályok, kettős törés	22
2.6 Nyaláb polarizáció és feloldás	24
2.6.1 Polarizáció hatása optikai mikroszkóp feloldására.....	24
2.6.2. Radiálisan polarizált nyaláb előállítása.....	26
3. Célkitűzések	27
4. Tudományos eredmények.....	28
4.1 Tomográfias optikai mikroszkóp (TOM).....	28
4.1.1 Rekonstrukció paramétereinek hatása a rekonstruált kép minőségére	30
4.1.2 TOM transzmissziós üzemmódban.....	39
4.1.3 TOM reflexiós üzemmódban	47
4.2 Intenzitásprofil manipulálása kettőtörő lemezzel	75
4.2.1 Fókuszszeparáció lineárisan poláros nyalábbal	76
4.3.2 Radilásian poláros nyaláb előállítása kettőtörő lemezzel.....	84
4.3.3 Diffrakció limitált csík létrehozása és forgatása kettőtörő lemezzel	90
5. Konklúzió	93
6. Summary	95
6.1. Introduction.....	95
6.2. Objectives.....	97
6.3. Materials and methods.....	98
6.4. New scientific results.....	100
Köszönetnyilvánítás.....	103
Irodalomjegyzék	104

Rövidítések jegyzéke

CCD	–	C harged C oupled D evice
CD	–	C ritical D istance
CT	–	C omputer T omography
DIRECTT	–	D irect I terative R econstruction of C omputed T omography T rajectories
DOF	–	D epth of F ocus
FBP	–	F iltered B ack- P rojection
FWHM	–	F ull W idth at H alf M aximum
LSF	–	L ine S pread F unction
MRI	–	M agnetic R esonance I maging
MTF	–	M odulation T ransfer F unction
NA	–	N umerical A perture
OPT	–	O ptical P rojection T omography
PALM	–	P hoto- A ctivated L ocalization M icroscopy
PMT	–	P hoto M ultiplier T ube
PSF	–	P oint S pread F unction
RAP	–	R adial A xial P olarizer
SLI	–	S tructured L ight I llumination
SLM	–	S patial L ight M odulator
STED	–	S timulated E mission D epletion
STORM	–	S tochastic O ptical R econstruction M icroscopy
TIRF	–	T otal I nternal R eflection F luorescence M icroscopy
TOM	–	T omographic O ptical M icroscope

1. Bevezetés

Az optikai mikroszkópok kiemelkedő szerepet töltenek be az élő tudományok analitikai eszköztárában. Segítségükkel megfigyelhetők olyan pár mikron és párszáz nanométer nagyságrendjébe eső biológiai minták, melyek sértetlen vizsgálatára más képalkotó eszközökkel - pl. elektronmikroszkóp - nincs lehetőség. Ezen előnynek köszönhetően az optikai mikroszkópok képalkotó teljesítményének növelése, valamint új optikai leképező eljárások kidolgozása kitüntetett iránya a tudományos kutatásoknak.

Egy optikai leképező rendszer legfőbb jellemzője, a rendszer feloldóképessége, melynek értékét a fény hullámtermészetéből eredő diffrakció és a rendszerre jellemző aberráció korlátozza. Az aberráció hatása az optikai rendszer minőségének növelésével jelentősen csökkenthető. A diffrakcióból eredő feloldás határa a Rayleigh, vagy a Sparrow kritériummal adható meg. Optimális (Köhler) kivilágítás esetén a legkisebb, a rendszer által még feloldható méret jól közelíthető az alkalmazott hullámhossz felével, mely laterális irányban $\sim 200\text{nm}$, tengelyirányban $\sim 400\text{nm}$ környékére esik, látható tartományú fényforrást feltételezve. Ezen érték csökkentésére az utóbbi három évtizedben intenzív kutatómunka irányult, melynek eredményeképpen olyan képalkotó megoldások születtek, mint a konfokális mikroszkóp, 4Pi mikroszkóp, kép interferencia mikroszkóp, többfotonos mikroszkóp, STED mikroszkóp, pásztázó közeltér mikroszkóp [1], valamint a PALM [2] és a STORM [3]. A felsorolt módszerek egy részének feloldása pár százalékkal, míg egyes eljárásoké akár tízszeresével is meghaladhatja az említett kritikus méretet. A legtöbb megoldás azonban nem alkalmazható tetszőleges kiterjedésű és anyagú minták vizsgálatára, az esetek nagy részében jelzőmolekulák használata szükséges melyek fluoreszcenciáját mérik és értékelik ki a módszerek. A nemlineáris jelenségeken alapuló eszközök intenzív kivilágítást igényelnek, melyek roncsolhatják a biológiai mintákat (photobleaching).

A hagyományos mikroszkópokkal ellentétben, egyes képalkotó rendszerek a vizsgált tárgy egy belső metszetéről szolgáltatnak részletes információt. Ilyen, az optikai tartományban működő, pásztázó konfokális mikroszkóp, a TIRF, illetve az optikai projekciós tomográf (Optical Projection Tomograph, OPT)[4]. A konfokális mikroszkópia a legkorábbi olyan képalkotó eljárás, mely a feloldás határának növelését célozza, az optikai tengely irányában. A módszer hatékonyan szűri a tárgy vizsgálni kívánt szeletén kívülről érkező fényinformációt, így a még axiális irányban feloldható távolság megközelítőleg $\sqrt{2}$ -ed része a hagyományos optikai mikroszkópénak. Hátránya azonban, hogy a minta képét ponttal történő pásztázás

segítségével állítja elő, ami időigényes folyamat. Az optikai projekciós tomográf az orvosi diagnosztikában használt computer tomográf (CT) optikai tartományban működő megvalósítása. A CT eredeti elve esetén a vizsgált objektumot egy kollimált röntgennyaláb világítja át. Az objektumon átjutó röntgenintenzitás mérhető, miközben a sugárforrás és a vele szemben elhelyezkedő detektor egymással párhuzamosan mozog. A mérést több irányból megismételve, numerikus algoritmus segítségével az objektum belső szerkezetének egy síkja megjeleníthető. Az OPT a látható tartományba eső fényt fókuszál át a mintán és hasonlóan a CT-hez, az átjutó fényintenzitást méri. Lényeges különbség azonban, hogy míg a CT esetén az alkalmazott röntgen tartományban a sugarak keresztmetszete a tárgy teljes hosszában jóval kisebb, mint a rekonstrukciónál használt képelem mérete, addig a látható hullámhossztartományban nem elhanyagolható a diffrakció hatása. A diffrakció miatt a mintának, az optikai tengelytől távolabb eső részei is módosítják az átjutó fény intenzitását, ami a keletkező képen hibát okoz. Az előbbieket miatt az OPT nem képes a Rayleigh-féle feloldási kritérium környéki, vagy az alatti részletek megjelenítésére. További hátránya, hogy a használt minta nem lehet tetszőleges vastagságú és nem hengerszimmetrikus minta esetén az optikai úthossz változik a pásztázás szögével.

Jelen értekezés témája egy olyan optikai képalkotó eljárás elméleti és kísérleti vizsgálata, mely ötvözi a tomográfiában használt képrekonstrukció elvét, a vonallal pásztázó (line-scanning) konfokális mikroszkópok felépítésével. A leírás során számításokkal vizsgálom az alkalmazott rekonstrukció paramétereinek képminőségre gyakorolt hatását. Bemutatom és jellemzem a leírt eljárást megvalósító eszközt, a Tomográfiás Optikai Mikroszkóp (Tomographic Optical Microscope, TOM), két változatát. Az első változat transzmisszióban méri a rekonstrukcióhoz szükséges fényinformációt miközben a minta síkjára képezett, nem áteresztő éllel pásztázza a minta vizsgált tartományát. A második változatban, a pásztázás a minta felszínére fókuszált fénycsíkkal történik és a reflektált fényintenzitást mérjük. Mindkét változatnál kritikus feltétel, hogy a pásztázás irányát változtató mechanika forgástengelye egybeessen a rendszer kijelölt optikai tengelyével. Ez a feltétel csak bizonyos pontossággal teljesíthető, így megoldásként bemutatok egy olyan eljárást, mely mérés közben korrigálja a tengelyhibát.

A tengelyhiba korrekciója jelentősen megnöveli a mérési időt és összetett jelfeldolgozó elektronika használatát igényli. A korrekció elhagyható a rendszerből olyan optikai elem használatával, mely képes előállítani és elforgatni a pásztázáshoz szükséges fénycsíkot és ezzel együtt érzéketlen a forgástengely laterális irányú elmozdulására. Ilyen optikai elem készíthető kettőstörő síkpárhuzamos lemez segítségével, melyen az áthaladó

extraordinárius sugármenet erős asztigmatizmust vezet be. A kettőtörő lemezen történő átfókuszálás alkalmas a pásztázó nyaláb intenzitásprofiljának manipulálására is, mely ideális esetben az optikai rendszer feloldóképességének növekedéséhez vezethet. Az értekezésben megvizsgálom, hogyan függ a keletkező fókusz intenzitáseloszlása a használt kristály tulajdonságaitól, illetve a kivilágító nyaláb polarizációjától.

2. Tudományos háttér

A következő fejezetekben áttekintem azokat a fogalmakat és eljárásokat, melyek ismerete szükséges a dolgozatban megfogalmazott állítások helyes értelmezéséhez.

2.1 Képalkotó rendszerek feloldóképessége

Az optikai képalkotó rendszerek térbeli feloldó képessége adja meg, azt a minimális távolságot két, pontszerű objektum között, mely távolságnál az objektumok egymástól megkülönböztethetők a keletkező képen. A diffrakció miatt, a térbeli feloldásnak a kivilágító fény hullámhossza szab határt. Sokáig élt az elképzelés, miszerint a diffrakció korlátja nem enged a hullámhossz felénél jobb térbeli feloldást egy leképező rendszernek. Az elmúlt évek kutatási eredményei rámutatnak arra, hogy ez az abszolútnak hitt határ megkerülhető [1].

Tetszőleges képalkotó rendszer feloldóképessége leírható az ún. pontátviteli függvény (Point Spread Function, PSF) segítségével, mely megadja egy pontszerű fényforrás optikai diffrakció miatt kiszélesedett képét. Ez a kiszélesedés az optikai rendszer térbeli frekvencia szűrésével magyarázható. Egy tökéletesen pontszerű tárgy leírható a Dirac-féle delta függvénnyel, melynek Fourier spektruma konstans. Az optikai rendszer egy meghatározott térbeli frekvencia felett nem engedi át a spektrális komponenseket, így a delta függvény a képsíkban kiszélesedik [5]. A kiszélesedés mértéke és a PSF alakja a leképező rendszer minőségétől függ. Egységnyi átmérőjű, kör alakú apertúra esetén, pontszerű fényforrás PSF-je az optikai tengelyre merőleges irányban hengerszimmetrikus. A fényforrás képének intenzitáseloszlása radiális irányban:

$$I = I_0 \left[2 \frac{J_1(2\pi \rho)}{(2\pi \rho)} \right]^2, \quad \rho = \frac{NAr}{M\lambda} \quad (2.1)$$

alakú, ahol J_1 az első rendű Bessel függvényt jelöli, NA a rendszer numerikus apertúrája, M a nagyítása, λ a kivilágító fény hullámhossza és I_0 a rendszerre jellemző konstans [6]. A 2.1 által leírt görbét Airy függvénynek is nevezik. A rendszer feloldóképességét az a sugárirányú távolság adja meg, ahol az Airy függvény zérus értéket vesz fel. Ez a távolság jó közelítéssel megegyezik a függvény félértékszélességével. Egységnyi nagyítás esetén ez az érték:

$$\Delta x = 0,61 \frac{\lambda}{NA}. \quad (2.2)$$

Két, pontszerű objektum képe akkor különböztethető meg, ha az egyik pontátviteli függvényének maximuma a másik pontátviteli függvényének minimumára esik. Ez a Rayleigh-féle feloldási kritérium. Rész apertúra esetén a rendszer feloldása a vonalátviteli

függvény segítségével adható meg (**L**ine **S**pread **F**unction, LSF). Egységnyi szélességű rést feltételezve, az LSF keresztmetszete - a résre merőleges irányban, - valamint a görbéhez tartozó félértékszélesség [7]:

$$I = I_0 \left[\frac{\sin(2\pi \tilde{x})}{(2\pi \tilde{x})} \right]^2, \quad \Delta x = 0,5 \frac{\lambda}{NA}. \quad (2.3)$$

Látható, hogy a rendszer apertúra függvényének változtatásával csökkenthető két objektum feloldásához szükséges minimális távolság, egy adott irány mentén. A képalkotó rendszer feloldásának hatásos növeléséhez azonban az így elért távolság csökkenés kiterjesztése szükséges az objektív síkjának minden irányában.

Azoknál az alkalmazásoknál, ahol a minta egy jól meghatározott rétegéből kívánunk információt nyerni, a rendszer tengely irányú feloldóképessége is mérvado. Ez az érték arányos a rendszer axiális irányú átviteli függvényével, mely

$$I = I_0 \left[\frac{\sin(\pi \tilde{z})}{(\pi \tilde{z})} \right]^2, \quad \tilde{z} = \frac{NA^2 z}{2n'M^2 \lambda}, \quad (2.4)$$

ahol n' a képoldali közeg törésmutatója, z az axiális tengelykoordináta. A függvény félértékszélessége definíció szerint megegyezik az optikai rendszer tengely irányú feloldóképességével, mely más néven a mélységélesség. Ennek nagysága:

$$\Delta z = 2n' \frac{M^2 \lambda}{NA^2}. \quad (2.5)$$

A legkisebb sugárzó, elektromágneses egység a dipólus. Ha a dipólust tekintjük pontszerű fényforrásnak, az előző összefüggések akkor érvényesek, ha a dipólus momentum iránya merőleges az optikai tengelyre. Amennyiben ez az irány párhuzamos az optikai tengellyel, a rendszer PSF-jét másodrendű Bessel függvény írja le [6]. A Rayleigh-féle feloldási kritérium akkor igaz változatlan formában, ha mindkét megkülönböztetni kívánt dipólus momentumának iránya egymással párhuzamos és merőleges a rendszer optikai tengelyére, valamint nagyságuk megegyezik. Általános esetben a feloldás definíciója függ attól, milyen előzetes ismereteink vannak a pontszerű fényforrások térbeli, időbeli és koherencia tulajdonságairól.

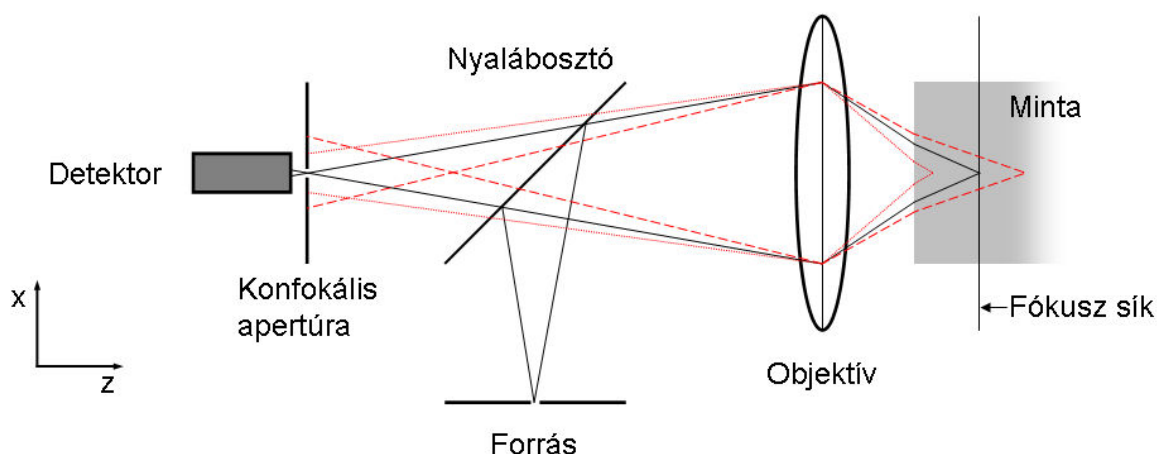
A 2.2 és 2.5 összefüggések szerint az optikai rendszer feloldása növelhető a detektált hullámhossz csökkentésével valamint a rendszer numerikus apertúrájának növelésével. Mindkét megoldásnak vannak technikai korlátai melyek megakadályozzák, hogy a feloldóképesség minden határon túl növelhető legyen. Ha pontosan ismert a rendszer pontátviteli függvénye, egymástól tetszőlegesen kis távolságra lévő pont feloldható

dekonvolúció segítségével [8]. Ez csak akkor teljesíthető, ha a rendszer információ átvitele tökéletesen zajmentes. Azt feltételezve, hogy a rendszerben használt optikai elemek és detektorok zaja teljesen kiküszöbölhető, a fény kvantumozásából eredő ún. kvantumzaj ekkor is limitálja a feloldást. Ha Δk az optikai rendszer által átvitt térfrekvencia sávszélessége és Δr a kritikus méret, akkor ezt a limitet a következő összefüggés írja le:

$$\Delta k \Delta r \geq 1. \quad (2.6)$$

2.2 Pásztázó konfokális mikroszkóp

A laterális feloldás növelésén túl a modern képalkotó eljárásoknak kitüntetett feladata az objektum egy síkszeletéről úgy információt nyerni, hogy a vizsgált síktól különböző rétegekből származó szórt fény a képen ne jelenjen meg. Erre alkalmas, széles körben alkalmazott eszköz a pásztázó konfokális mikroszkóp [9].

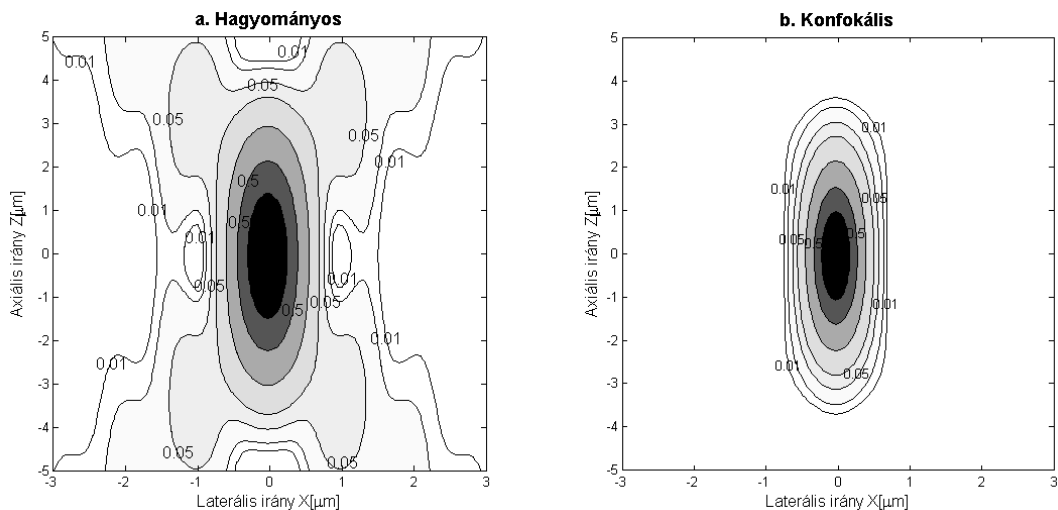


1. ábra: Konfokális leképezés elve.

Az eszköz vázlatos felépítése az 1. ábrán látható. A pontszerű, monokromatikus fényforrás által kibocsátott fényt – nyalábosztó elemen történő reflexió után – mikroszkóp objektív segítségével a mintába, vagy annak felszínére fókuszáljuk. A mintát egy diffrakció limitált kis térfogatban világítjuk ki. Az innen visszaverődő fényt ugyanez az objektív gyűjti össze és fókuszálja keresztül egy kör alakú apertúrán (konfokális apertúra). Az apertúrán átjutott fényt, erősségétől függően egyszerű fotodiódával vagy fotoelektron sokszorozóval detektáljuk. A kép a kivilágított térfogat mintán történő pásztázásával és a mért jel digitalizálásával hozható létre. Ha a visszavert fény a fókuszsíktól eltérő rétegből származik, azt az objektív nem az apertúrába fókuszálja, így annak elenyészően kis hányada jut a detektorba (1. ábra, vörös, szaggatott és folytonos sugármenetek). Ennek eredményeként csak

a fókusz síkból származó információt detektáljuk. A módszer használható transzmissziós üzemmódban is [10],[11]. Ekkor a mintát kivilágító és az azon keresztülhaladó fényt összegyűjtő objektívek célszerűen azonos numerikus apertúrájúak [12]. Ha a minta transzparens a kivilágító fény hullámhosszára nézve, akkor a minta háromdimenziós képe előállítható, a fókusz sík léptetésével és az adott sík pásztázásával [13].

Mivel a képalkotásban mindkét objektív azonos szereppel vesz részt, a rendszer eredő pontátviteli függvénye az egyes objektívek pontátviteli függvényének szorzata [14]. Reflexiós üzemmódban ez megegyezik a használt objektív pontátviteli függvényének négyzetével. A 2. ábrán számolt, normált pontátviteli függvények kétdimenziós eloszlásai láthatóak hagyományos és konfokális elrendezés esetén. A konfokális eloszlás számolásánál infinitezimálisan kicsi túlyuk átmérőt feltételeztem. Jól látható, hogy hagyományos leképező rendszernél több energia jut a fókuszon kívüli tartományba.



2. ábra: Számolt és normált PSF eloszlás (a.) hagyományos és (b.) konfokális rendszer esetén.

Mivel a négyzetes PSF-hez kisebb félértékszélesség tartozik, így az elmélet mind laterális, mind axiális irányban $\sqrt{2}$ -ször nagyobb feloldást jósol a konfokális rendszernek a hagyományos mikroszkóphoz képest. Ennek következtében a pásztázó térfogatelem harmadára csökken, ami jelentős előny a nem konfokális elrendezésekkel szemben. Ez a feloldás növekedés azonban csak akkor érvényes, ha a konfokális apertúra átmérője infinitezimálisan kicsi, azaz a rendszerben egy tökéletes pontdetektor található [15]. Ebben az esetben meredeken lecsökken a detektálható jel erőssége, ami technikai korlátot szab az apertúra tetszőleges szűkítésének.

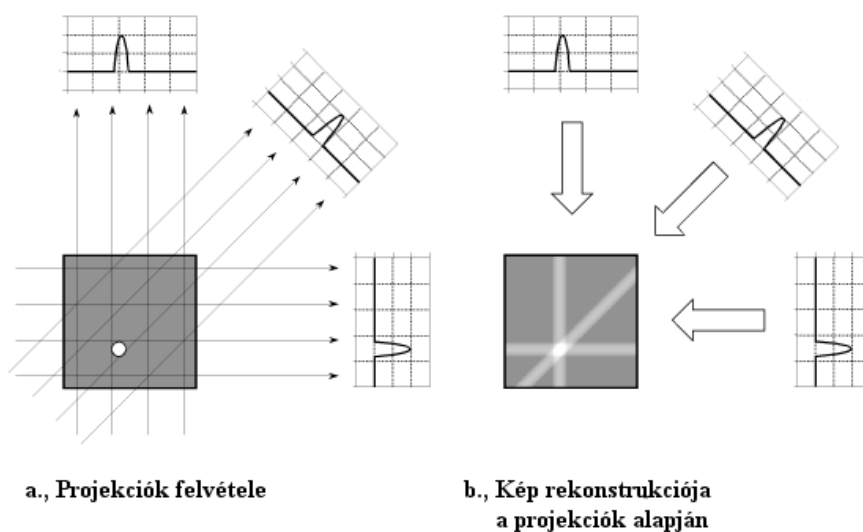
A pásztázó konfokális mikroszkópot elterjedten alkalmazzák fluoreszcens üzemmódban [16]. Ilyenkor a minta olyan fluoreszcens festéket tartalmaz, mely egyfotonos gerjesztés esetén a gerjesztő fény hullámhossznál nagyobb, míg kétfotonos gerjesztésnél kisebb hullámhosszúságú fényt bocsát ki. Az elrendezésben nyalábosztó elem helyett dikroikus tükröt alkalmaznak, mely csak az emittált fluoreszcens fényt engedi a detektorba. A módszer segítségével jelentősen növelhető a minta megfestett részeinek kontrasztja a rögzített képen. A gyakorlat azt mutatja, hogy a konfokális mikroszkóp fluoreszcens alkalmazásánál érvényesülnek leginkább a fent említett, a rendszer feloldásának javulását eredményező hatások [17].

Több olyan képalkotó eljárás és eszköz létezik, melyek a konfokális mikroszkópia elvére épülnek és a Rayleigh-féle feloldási határ alatti részletek megjelenítésére képesek. Ilyen eljárás a közeltér pásztázó mikroszkópia, ahol a tárgyról visszaverődő ún. evaneszcens hullámok összegyűjtésével jeleníthetők meg további részletek a képen [18]. Az evaneszcens információ méréséhez a detektort a kivilágító hullámhossznál kisebb távolságban kell a minta felett mozgatni. Másik ilyen megoldás a 4Pi [19], vagy Theta [20] mikroszkópia, ahol több objektív segítségével közel izotróppá teszik a térbeli intenzitáseloszlást a fókuszban. Ezzel a módszerrel jelentősen csökkenthető a rendszer axiális feloldása. Megnövelt felbontóképesség érhető el speciális fluoreszcens festékek nemlineáris fénykibocsátó hatását felhasználva. Ebben az esetben a gerjesztő fény frekvenciájánál nagyobb frekvenciájú fotonokat emittál a festék. Ilyen eszközök a többfotonos, vagy nemlineáris fluoreszcens mikroszkópok [21]. A mintát kivilágító intenzitás térbeli manipulálására épülő eljárások közül a két legígéretesebb az SLI (**Structured Light Illumination**) és a STED (**Stimulated Emission Depletion**) technikák. Az SLI eljárásnál olyan periodikus interferencia képet hoznak létre a mintán, melynek periódusa megegyezik az alkalmazott objektívvel és hullámhosszal elérhető kritikus mérettel. A visszavert fényt összegyűjtik, melyre ráakódik egy moiré-minta a strukturált kivilágítás következtében. Ez a moiré-minta többlet információt hordoz a tárgy kritikus határon túli frekvencia komponenseiről, így rekonstrukció segítségével a hagyományos mikroszkópénál kétszer nagyobb feloldóképesség érhető el [22]. A STED esetén a fluoreszcens festéket gerjesztik, majd gerjesztett állapotából egy gyűrű alakú fókuszált nyalábbal visszakényszerítik alapállapotba. A gyűrű közepén található rész azonban továbbra is gerjesztett állapotban marad. Az így lecsökkentett területről származó fluoreszcens fényt detektálják pontról pontra [23]. A STED technika segítségével a rendszer laterális feloldása akár 20-30nm is lehet.

2.3 Optical Projection Tomography képalkotó eljárás

Egy tárgy háromdimenziós képe megadható a tárgy síkszeleteinek direkt módon történő leképezésével és egymáshoz illesztésével. Erre alkalmas eszköz az előző fejezetben bemutatott pásztázó konfokális mikroszkóp. Vannak olyan esetek, amikor a direkt leképezés nem lehetséges a minta roncsolása nélkül, annak geometriai, vagy anyagszerkezeti tulajdonságai miatt. Ilyenkor használhatóak az ún. projekciós tomográfiai eljárások, mint az orvosi diagnosztikában elterjedt CT [24], MRI (**M**agnetic **R**esonance **I**maging), vagy az előzőnek az optikai tartományra kiterjesztett megvalósítása, az OPT (**O**ptical **P**rojection **T**omograph) [25].

A projekciós tomográfia indirekt képalkotó módszer. A minta belsejéről úgy jutunk információhoz, hogy azt átvilágítjuk valamilyen sugárforrás segítségével és mérjük a minta árnyékát, más néven projekcióját. Ahol a minta nagyobb részt nyel el az átvilágító nyaláb energiájából, ott az árnyék sötétebb lesz, ahol kevesebbet ott értelemsszerűen világosabb. Ezt mutatja a 3.a. ábra. Ha a minta árnyékát több irányból rögzítjük, akkor a kapott adathalmazból a belső szerkezet képe numerikus algoritmus segítségével kiszámolható (3.b. ábra).



3. ábra: Projekciós tomográfia elvének vázlatos ismertetése.

Az OPT képalkotási folyamata nagyon hasonló a CT működési elvéhez. Fontos különbség azonban, hogy a mintát átvilágító nyaláb hullámhossza a látható, vagy a láthatóhoz közeli infravörös tartományba esik. A nyalábot átfókuszálják a vizsgált tárgyon és mérik az átjutó fényintenzitást. Az eszköz segítségével olyan sérülékeny biológiai minták belső szerkezetének háromdimenziós képe állítható elő, melyek vastagsága elérheti a 15 millimétert [26]. Háromdimenziós képalkotásra a pásztázó konfokális mikroszkópok is alkalmasak, de ebben

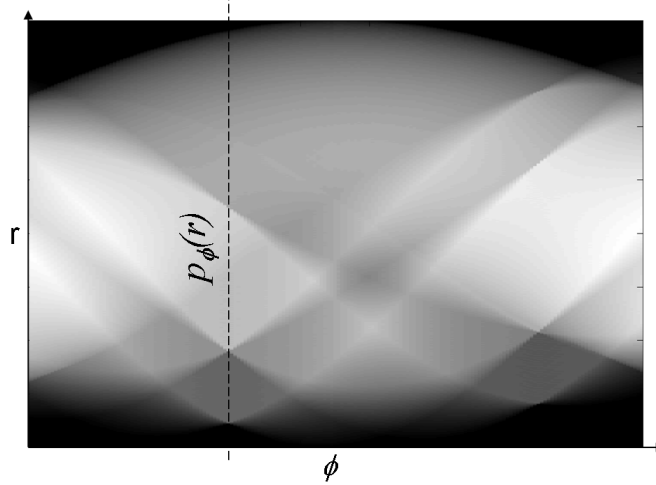
az esetben a minta nem lehet vastagabb néhány száz mikronnál. Nagyobb méret esetén a mintát megfelelő vastagságúra szeletelik, majd egyenként készítének felvételt a szeletekről. Az így rögzített adatok az eljárás végén összeilleszthetők. A keletkező 3D kép azonban gyakran hibás részleteket tartalmaz, mivel a szeletelés során a minta torzulhat és az összeillesztés sokszor nem elég pontos. Az OPT-vel készült felvétel mentes ezektől a hibáktól.

A CT a képalkotás során röntgensugarakkal világítja át a vizsgált tárgyat. Kis kiterjedésű tárgy esetén (~2-5cm) a sugarak a transzmisszió során nem törnek és nem szóródnak jelentősen, így a felvett árnyék minden pontjára igaz, hogy az a minta elnyelő képességének egy vonal menti integrálösszege. Ez a látható tartományban működő OPT-re csak az alkalmazott optika mélységélességének megfelelő tartományában igaz. Ahhoz, hogy kiterjedt mintán történő átfókuszálás után a képet ne terhelje a törésből és szórásból eredő hiba, nagy mélységélességű rendszer használata szükséges. Ekkor azonban az eszköz laterális irányú feloldása jelentősen csökken. Szemben a konfokális mikroszkópok átlagosan 200nm-es felbontásával, az OPT-vel mindössze 5-10 μ m nagyságú részletek megkülönböztethetők.

2.4 Képrekonstruáló algoritmusok

Ha mintát folytonosnak tekintjük a vizsgált tárgy kétdimenziós, optikai képe megfeleltethető egy kétváltozós, valós skalárfüggvénynek. A képalkotás során, a skalárfüggvény által felvett értékek meghatározása a cél egy alkalmasan választott koordináta rendszerben. Digitális képalkotásnál a függvényértékek meghatározására csak diszkrét koordináta pontokban van lehetőség. Descartes rendszert feltételezve, az ilyen pontokhoz tartozó függvényérték $f(x,y)$ adja a felvett kép egy pixelét. Ekkor a koordináta pontok egymáshoz viszonyított távolsága megegyezik a képet alkotó pixelek méretével. A kép felbontása növelhető a pixelméret csökkentésével.

A CT esetén az $f(x, y)$ érték a minta intenzitás elnyelő képességének feleltethető meg a röntgen tartományban, de általános esetben ez az érték a vizsgált minta tetszőleges fizikai tulajdonsága lehet. A pásztázási irányt $\Delta\phi$ szöggel változtatva és az új irányhoz tartozó projekciókat rögzítve a tárgyat egyértelműen leíró, (r, ϕ) szerint változó függvényt kapunk. Ez a karakterisztikus függvény a tárgy **szinogramja**.



5. ábra: Tárgy szinogramja.

2.4.1 Visszavetítés

A szinogram egyértelműen jellemzi a vizsgált tárgy adott fizikai tulajdonságának térbeli eloszlását, így az eloszlás rekonstruáló algoritmus segítségével visszanyerhető. A számítógép vezérelt tomográfia fejlődésének története során több, különböző algoritmus is alkalmasnak bizonyult képrekonstrukcióra. Ilyen a visszavetítéses módszer, az iteratív módszer, Fourier-, valamint az analitikus-rekonstrukció, vagy az úgynevezett DIRECTT eljárás [27],[28], de a képminőség és gyorsaság kedvező arányának köszönhetően a szűrt-visszavetítéses módszer, röviden az FBP (**F**iltered **B**ack-**P**rojection) a leginkább elterjedt.

A legegyszerűbb képrekonstruáló módszer, a visszavetítés során egy adott képpont intenzitását úgy kapjuk meg, hogy a projekciók adott ponton áthaladó értékeit összegezzük. Diszkrét esetben, a projekciók számára normált intenzitás értéket a következő összefüggés adja meg:

$$\hat{f}(x, y) = \sum_{j=1}^m p((x \cos \phi_j + y \sin \phi_j), \phi_j) \Delta\phi, \quad (2.8)$$

ahol ϕ_j a j-ik projekció y tengellyel bezárt szöge, $\Delta\phi$ két szomszédos projekció által bezárt szög, valamint m a projekciók száma és $\Delta\phi = \pi / m$. A módszer hátránya, hogy a visszavetített projekció értékek nem csak az adott képpont intenzitását növelik, hanem minden

képpontét a projekció iránya mentén, így a keletkező kép kontúrjai elmosódnak és azon egy fényes háttér, úgynevezett glória jelenik meg (lásd: 6.a. ábra).

2.4.2 Fourier rekonstrukció

Egy kétdimenziós skalárfüggvény egyértelműen leírható annak Fourier transzformáltjával. Ezt kihasználva egy tárgy diszkrét pontokból álló képe is jellemezhető annak diszkrét Fourier transzformáltjával, a következő feltételekkel:

a.: A képpontok távolsága (w) állandó.

b.: A projekciók függvényértékeinek távolsága (Δr) állandó és megegyezik w -vel.

A vizsgált tárgy képének Fourier transzformáltja a következő formulával adható meg:

$$F(k_x, k_y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \exp[-2\pi i(k_x x + k_y y)] dx dy. \quad (2.9)$$

Az összefüggésben az $f(x, y)$ szinusz és koszinusz hullámok összegeként áll elő, ahol k_x és k_y az x és y irányok menti térfrekvenciák. A legnagyobb előforduló térfrekvenciát a képpontok távolsága limitálja ($k_{\max} = \frac{1}{2w}$). Az $f(x, y)$ függvény inverz Fourier transzformációval számolható:

$$f(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(k_x, k_y) \exp[2\pi i(k_x x + k_y y)] dk_x dk_y. \quad (2.10)$$

A (2.9) összefüggés átírható a 4. ábrán látható (r, s) koordináta rendszerre a következő feltételekkel:

$$\phi = \arctg\left(\frac{k_y}{k_x}\right), \quad (2.11a)$$

$$k = \sqrt{(k_x^2 + k_y^2)}. \quad (2.11b)$$

A (2.9) összefüggés a megváltoztatott koordinátákkal felírva a következő alakú:

$$F(k_x, k_y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \exp(-2\pi ikr) dr ds. \quad (2.12)$$

Az integrálás sorrendjét felcserélve látható, hogy a ds szerinti integrál nem más, mint a (2.7a) összefüggésben definiált, ϕ szöghöz tartozó $p_\phi(r)$ projekció, így:

$$F(k_x, k_y) = \int_{-\infty}^{\infty} p(r, \phi) \exp(-2\pi ikr) dr = P(k, \phi), \quad (2.13)$$

ahol $P(k, \phi)$ a ϕ szöghöz tartozó projekció Fourier transzformáltja. A fenti összefüggés segítségével a tárgy képe rekonstruálható úgy, hogy először vesszük a projekciók Fourier transzformáltját, majd megfelelő interpolációval meghatározzuk az egyes képpontokban a Fourier együtthatókat, végül az így kapott kétdimenziós tömböt inverz Fourier transzformáljuk.

2.4.3 Szűrt-visszavetítés

A szűrt-visszavetítéses módszer (FBP) az előzőekben ismertetett két eljárás ötvözete. Egy tárgy képének a kétdimenziós Fourier transzformáltját a (2.9) összefüggés írja le. Ha változócserevel Descartes koordináta-rendszerből polárkoordinátákra térünk át, az összefüggés a következő alakot ölti:

$$f(x, y) = \int_0^\pi \int_{-\infty}^{\infty} F(k \cos \phi, k \sin \phi) \exp[2\pi k i(x \cos \phi + y \sin \phi)] |k| dk d\phi, \quad (2.14)$$

ahol

$$k_x = k \cos \phi \quad k_y = k \sin \phi. \quad (2.15)$$

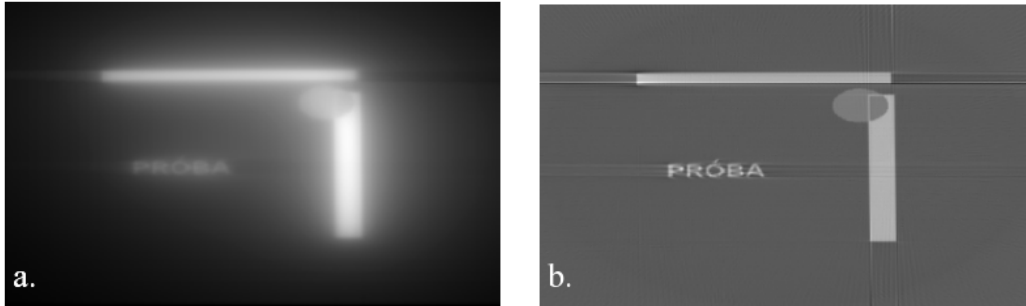
A kapott formulába, $F(k \cos \phi, k \sin \phi)$ helyére behelyettesíthető egy ϕ szerinti projekció Fourier transzformáltja a (2.13) alapján, így a rekonstruált kép a következő összefüggéssel nyerhető:

$$f(x, y) = \int_0^\pi \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} p(r, \phi) \exp(-i2\pi kr) dr \right\} |k| \exp(i2\pi kr) dk d\phi. \quad (2.16)$$

A $|k|$ -kel való szorzás a projekció Fourier térben történő szűréseként értelmezhető, amely felerősíti a nagyfrekvenciás komponensek hatását. A fenti formulát kifejtve a zárójelek szerint belülről kifelé haladva, a szűrt-visszavetítés algoritmus egyes lépéseit kapjuk.

Sorrend	Eljárás	Műveletigény
1.	Felvett projekció Fourier transzformálása.	$2n \log_2 n$
2.	Fourier együtthatók szorzása $ k $ -val (szűrés).	n
3.	A szűrt projekció inverz transzformálása.	$2n \log_2 n$
4.	Visszavetítés.	n^2
5.	A fentiek alkalmazása minden projekcióra.	m
Teljes műveletigény:		$\approx mn^2$

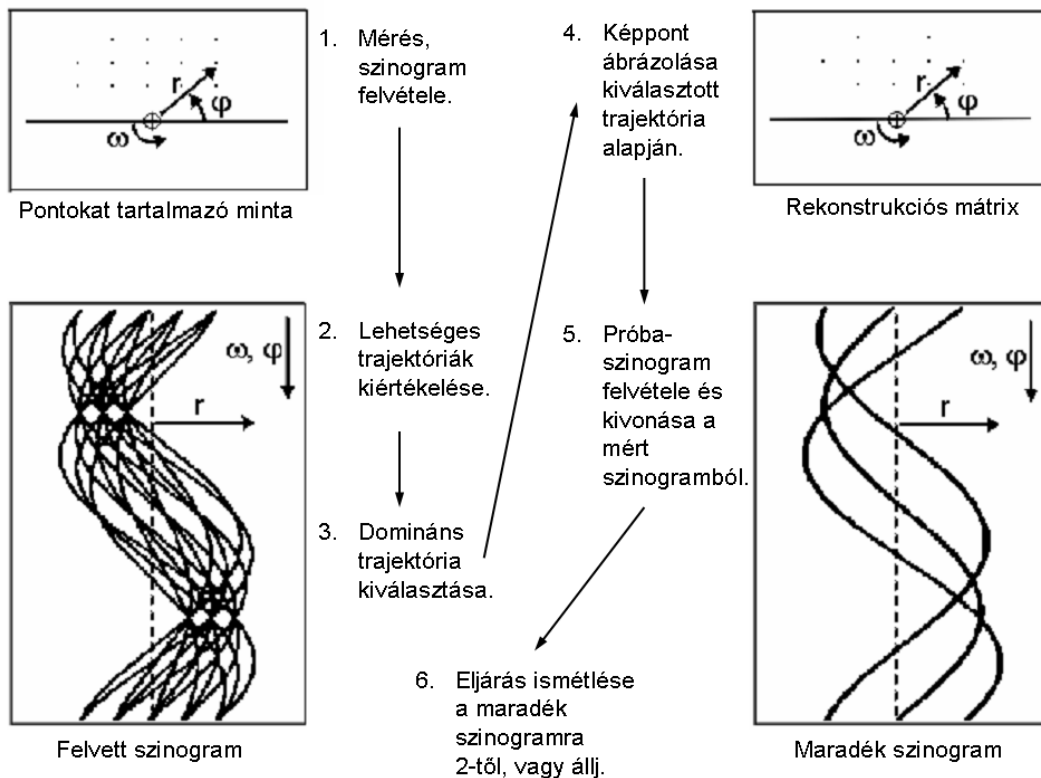
A fenti táblázatban m a felvett projekciók, míg n a projekciókat alkotó függvényértékek száma. Az eljárással rekonstruált képek mentesek a fent említett glória hatástól, így a rajtuk szereplő minták kontúrja is jóval élesebb, ahogyan az a 6. ábrán látható.



6. ábra: Rekonstruált kép (a.) visszavetítéses és (b.) szűrt-visszavetítéses módszerrel.

2.4.4 DIRECTT eljárás

A szűrt-visszavetítéstől eltérően a Direct Iterative Reconstruction of Computed Tomography Trajectories (DIRECTT) [28],[29] algoritmus nem alkalmaz Fourier transzformációt, így a rekonstruált kép felbontását nem korlátozza a projekciók finomságára (Δr) érvényes Nyquist-féle mintavételi törvény. Az algoritmus vázlatos menete a 7. ábrán látható.



7. ábra: DIRECTT képrekonstrukciós eljárás számolási menetének vázlata.

A vizsgált minta minden képpontja megfeleltethető a felvett szinogramon egy adott amplitúdójú és fázisú szinusz trajektóriának. Az összes lehetséges trajektóriát intenzitás, kontraszt vagy tetszőleges feltétel alapján rendezve, kiválasztható egy vagy több domináns trajektória, melyekből felépíthető egy ideiglenes kép, az úgynevezett rekonstrukciós mátrix. Ha a rekonstrukciós mátrix alapján felvett próba-szinogramot kivonjuk az eredetileg mértből és az így kapott maradék szinogramra megismételjük az eljárást, akkor az egyes lépésekben számolt ideiglenes kép információ tartama fokozatosan közelít az eredeti minta eloszlásához. Az iteráció egy értelmesen választott kilépési feltétel teljesüléséig tart. Az eljárás során a maradék szinogramon látható trajektóriák kontrasztja és a szinogram összintenzitása folyamatosan csökken így ezekkel jellemezhető az adott iterációs lépés jósága.

Az ismertetett algoritmus kevésbé érzékeny a mérési zajra, mint a szűrt-visszavetítés és hiányos, valamint $0-\pi$ szögtartománynál kisebb intervallumon rögzített szinogram esetén is jobb képminőséget nyújt. Hátránya azonban, hogy számítási költsége akár több tízszerese is lehet a korábban bemutatott eljárásokénak, ami nem tesz lehetővé nagy időfelbontású leképezést.

2.5 Anizotrop kristályok, kettőstörés

Az optikai leképező rendszerek egy adott térfrekvencia határon felül nem továbbítanak információt, ami korlátozza feloldóképességüket. Ez a frekvenciahatár az adott rendszerre jellemző és általános esetben a kivilágító hullámhossz, valamint az alkalmazott optika numerikus apertúrája határozza meg. Egyes rendszerparaméterek nem triviális megváltoztatásával azonban tovább növelhető az átvitt információ, amit az irodalom szuperfeloldásnak (superresolution) nevez. Szuperfeloldás érhető el az optikai rendszert kivilágító fény polarizációjának előnyös módosításával, amely megvalósítható anizotrop kristály használatával. Anizotrop kristály makroszkopikus optikai tulajdonságai függenek a rajta keresztül haladó fény terjedési irányától.

Klasszikus mechanikai modellt feltételezve az anyagot alkotó atomok egy harmonikus oszcillátornak tekinthetők, ahol a térben kötött atommaghoz rugókkal kapcsolódnak az elektronok, melyek egyensúlyi helyzetük körül rezegnek a tömegükkel és a rúgót jellemző elastikus konstanssal arányos sajátfrekvenciával [30]. Időben változó, külső elektromos tér hatására az elektronok kitérése arányos lesz a sajátfrekvencia négyzetének és a külső tér frekvencia négyzetének különbségével. Az elektronok kitérése határozza meg továbbá az anyagra jellemző törésmutatót. Izotróp anyag esetén az elektronok azonos rugókkal kapcsolódnak az atommaghoz, így sajátfrekvenciájuk is azonos, térbeni eloszlásuktól

függetlenül. Ennek következtében az anyagon áthaladó fény a terjedés irányától függetlenül egységes törésmutatót észlel. Ilyen anyagoknak tekinthetők a gázok, folyadékok és az amorf kristályok. Anizotrop anyagok esetén az atomok egy, az anyagra jellemző szerkezet szerint rendeződnek, ahol az egyes elektronok sajátfrekvenciája függ a szerkezetben megengedett elmozdulásuk irányától. Ennek hatására az anyagon áthaladó fény terjedési sebessége függ a terjedés irányától. Anizotrópia, kristályos és folyadékkristályos anyagszerkezet esetén figyelhető meg, ahol jellemző a továbbiakban ismertetett kettőtörés.

2.5.1 Optikai anizotrópia

Anizotrop, lineáris anyagokban az elektromos eltolás vektora (\mathbf{D}) és az elektromos térerősség vektor között az alábbi reláció áll fent:

$$D_i = \sum_j \varepsilon_{ij} E_j, \quad (2.17)$$

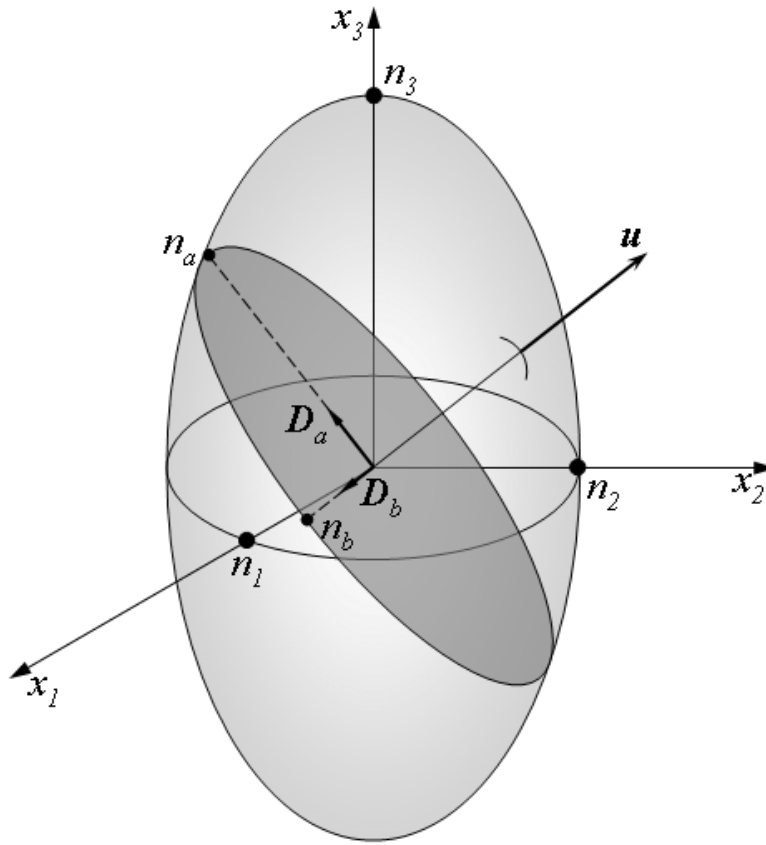
ahol $\{\varepsilon_{ij}\}$ az elektromos permittivitás tenzor. Ennek megfelelően, általános esetben az anyag dielektromos tulajdonságát kilenc független paraméter írja le. A legtöbb dielektrikum permittivitás tenzora azonban szimmetrikus ($\varepsilon_{ij} = \varepsilon_{ji}$), ami jelentősen leegyszerűsíti az optikai tulajdonságukat leíró formalizmust [5]. Ebben az esetben választható olyan koordináta rendszer, ahol a tenzor diagonálisán kívüli elemek eltűnnek, így az alábbi összefüggéshez jutunk:

$$D_1 = \varepsilon_1 E_1, \quad D_2 = \varepsilon_2 E_2, \quad D_3 = \varepsilon_3 E_3, \quad (2.18)$$

ahol $\varepsilon_1 = \varepsilon_{11}$, $\varepsilon_2 = \varepsilon_{22}$ és $\varepsilon_3 = \varepsilon_{33}$. Az így választott koordináta rendszer jelöli ki a kristály úgynevezett fősíkjait, vagy főtengelyeit, melyek mentén \mathbf{E} és \mathbf{D} párhuzamos. A főtengelyekhez tartozó törésmutatók:

$$n_1 = \sqrt{\varepsilon_1 / \varepsilon_0}, \quad n_2 = \sqrt{\varepsilon_2 / \varepsilon_0}, \quad n_3 = \sqrt{\varepsilon_3 / \varepsilon_0}, \quad (2.19)$$

ahol ε_0 a vákuum elektromos permittivitása. Anizotrop közegben, tetszőleges \mathbf{u} irányban terjedő síkhullám felbontható két, egymásra merőleges, lineárisan poláros módusra, melyek a terjedés során különböző törésmutatót érzékelnek (n_a , n_b). Ezek értéke egyszerűen meghatározható a 8. ábrán látható, az anizotrop anyagra jellemző törésmutató ellipszoid segítségével, melyet az alábbi összefüggés ír le:



8. ábra: Törésmutató ellipszoid.

$$\frac{x_1^2}{n_1^2} + \frac{x_2^2}{n_2^2} + \frac{x_3^2}{n_3^2} = 1. \quad (2.20)$$

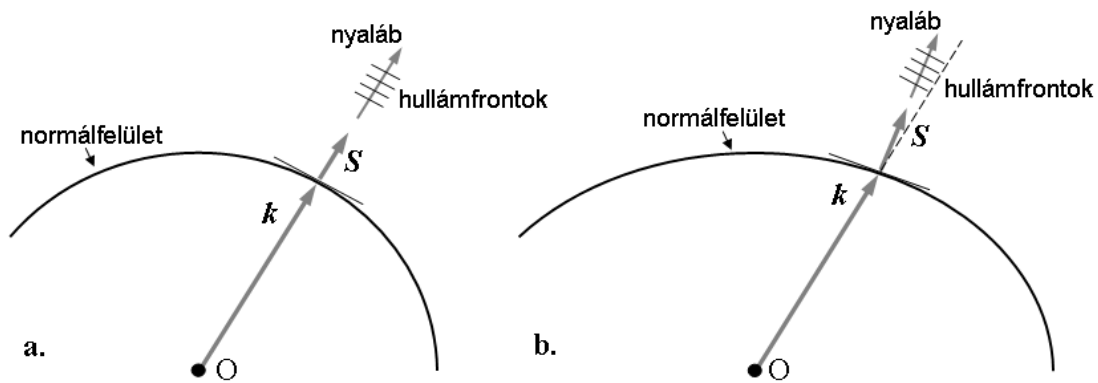
A törésmutató ellipszoidot a terjedés irányára merőleges síkkal elmet szve egy ellipszist kapunk, melynek főtengelyi jelölik ki a módusokhoz tartozó törésmutató értékeket és elektromos eltolás vektorokat (\mathbf{D}_a , \mathbf{D}_b).

Anizotrop közegben terjedő optikai hullám a következő mennyiségekkel jellemezhető, \mathbf{k} hullámvektor, \mathbf{E} , \mathbf{D} , \mathbf{H} , \mathbf{B} elektromos és mágneses tereket leíró vektormezők, valamint az energia terjedés irányát meghatározó komplex Poynting vektor, $\mathbf{S} = \frac{1}{2} \mathbf{E} \times \mathbf{H}^*$. A Maxwell egyenletekből levezethető, hogy \mathbf{D} merőleges a hullámvektorra és a \mathbf{H} mágneses térerősségre, ugyanakkor \mathbf{H} is merőleges a hullámvektorra, valamint \mathbf{E} elektromos térerősségre. Mivel \mathbf{S} Poynting vektor mind \mathbf{H} -ra, mind \mathbf{E} -re merőleges, így \mathbf{D} , \mathbf{E} , \mathbf{k} és \mathbf{S} azonos síkban fekszenek és erre a síkra merőleges irányba mutat \mathbf{H} és \mathbf{B} mágneses indukció. A fentiekből következik, hogy \mathbf{D} nem szükségszerűen párhuzamos az \mathbf{E} elektromos térerősséggel, valamint \mathbf{S} szintén nem minden esetben párhuzamos \mathbf{k} hullámvektorral. A fenti megfontolások alapján, valamint

a Maxwell egyenletek és (2.17) felhasználásával az elektromos térerősségre felírható az alábbi összefüggés:

$$\mathbf{k} \times (\mathbf{k} \times \mathbf{E}) + \omega^2 \mu_0 \varepsilon \mathbf{E} = 0, \quad (2.21)$$

melyet kielégít egy háromtagú, lineáris, homogén egyenletrendszer [31]. Az egyenletrendszernek létezik nem triviális megoldása, ha az azt leíró mátrix determinánsa zero. Ez a feltétel vezet az ω és \mathbf{k} közötti diszperziós relációhoz $\omega(k_1, k_2, k_3)$, mely egy felületet ír le a (k_1, k_2, k_3) térben ez az ún. normálfelület. Izotrop esetben a \mathbf{k} -t meghatározó normálfelület gömb, míg anizotrop közegben ellipszoid. Tetszőleges \mathbf{u} terjedési irány esetén, ezen felület és az \mathbf{u} metszéspontja adja meg az egyes módusokhoz tartozó hullámvektort, melynek nagysága $k = n\omega / c_0$. Mivel az \mathbf{S} Poynting vektor minden esetben merőleges a normálfelületre, izotrop közegben történő hullámterjedésnél \mathbf{k} és \mathbf{S} párhuzamos, míg az anizotrop eset egyes módusaira szöget zárnak be egymással, ahogy azt a 9. ábra mutatja.



9. ábra: Energiaterjedés izotrop közegben (a.) és anizotrop közegben általános módus esetén (b.).

2.5.2 Egytengelyű kristályok, kettős törés

Azokat a kristályokat, melyeknél – szimmetria tulajdonságaiknak köszönhetően – a (2.20)-ban szereplő mindhárom törésmutató értékek különbözik, kéttengelyű kristályoknak nevezzük. Ha a kristály tengelyeinek szimmetriája olyan, hogy a három fő törésmutató közül kettő megegyezik, akkor egytengelyű kristályról beszélünk. Egytengelyű kristály esetén a két különböző törésmutatót ordinárius ($n_1 = n_2 = n_o$) és extraordinárius ($n_3 = n_e$) törésmutatóknak hívják. Abban az esetben ha $n_e > n_o$, a kristály pozitív egytengelyű, míg $n_o > n_e$ esetén negatív egytengelyű. Az a kitüntetett terjedési irány, mely mentén az ordinárius és extraordinárius törésmutatók megegyeznek, a kristály optikai tengelye. (Magasabb szimmetriával rendelkező kristályok esetén mindhárom törésmutató nagysága megegyezik, így az anyag izotropnak tekinthető.)

Az egytengelyű kristályokhoz tartozó törésmutató ellipszoid egy forgási ellipszoid, így tetszőleges \mathbf{u} irányban terjedő hullám, mely θ szöget zár be a kristály optikai tengelyével olyan ellipszist metsz ki törésmutató ellipszoidból, melynek féltengelyei n_o és $n(\theta)$, ahol

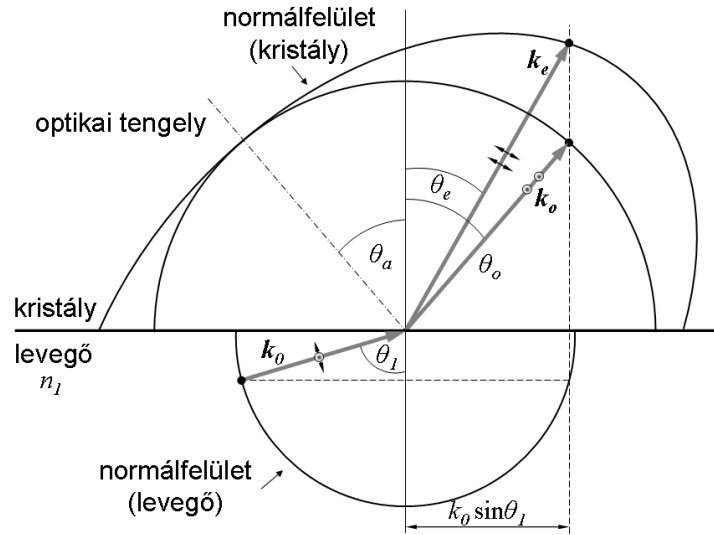
$$\frac{1}{n^2(\theta)} = \frac{\cos^2 \theta}{n_o^2} + \frac{\sin^2 \theta}{n_e^2}. \quad (2.22)$$

A két egymásra merőleges polarizációval rendelkező módushoz tehát egy terjedési iránytól független n_o (ordinárius) és egy irányfüggő $n(\theta)$ (extraordinárius) törésmutató tartozik. Ordinárius hullám esetén \mathbf{D} merőleges a hullámvektor és az optikai tengely által meghatározott síkra, valamint \mathbf{E} párhuzamos \mathbf{D} -vel. Extraordinárius esetben a \mathbf{D} szintén egy síkban fekszik \mathbf{E} -vel, de nem párhuzamos vele.

Izotrop közeg és egytengelyű anizotrop kristály határfelületén áthaladó fény kettőtörést szenved. Mivel a kristály két különböző polarizációval és fázissebességgel rendelkező módust támogat, így a beeső fény ordinárius és extraordinárius nyalábokra szétválva halad tovább. A határfelületen a fázis illesztés feltételét a Snellius-Descartes illetve módosított Snellius-Descartes törvény írja le, mely a két különböző módusra:

Ordinárius nyaláb esetén: $n_1 \sin \theta_1 = n_o \sin \theta_o, \quad (2.23)$

Extraordinárius nyaláb esetén: $n_1 \sin \theta_1 = n(\theta_a + \theta_e) \sin \theta_e. \quad (2.24)$



10. ábra: kettőtörés izotrop közeg és egytengelyű kristály felületén.

A beeső fény polarizációja szabja meg az egyes módusokba jutó energiát. Abban az esetben, ha a kristály optikai tengelye és a beesés síkja párhuzamos (10. ábra), az ordinárius

nyaláb polarizációja merőleges lesz a beesési síkra, míg az extraordinárius nyalábé a síkkal párhuzamos.

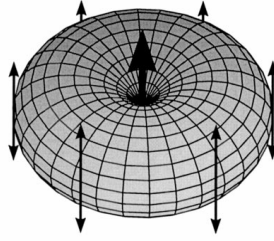
A kristály fontos jellemzője az optikai tengelyének iránya. Alkalmazott optikai elemként a kristályt két jelentős, egymástól eltérő orientáltságú tengellyel csiszolják. Ha a kivágott felület merőleges az optikai tengelyre s-típusú, párhuzamos esetben p-típusú kristályról beszélünk.

2.6 Nyaláb polarizáció és feloldás

Egy sugárzó dipólt, mint elemi fényforrást feltételezve a kisugárzott elektromágneses mező energiájának egy része nem terjed tovább, hanem a forrástól távolodva meredeken lecseng. Hagyományos képalkotó eszközök nem képesek ezt az úgynevezett evanescens mezőt összegyűjteni, így a létrehozott képről hiányzik a mező által hordozott információ. Léteznek azonban olyan rendszerek melyek továbbítják ezt az információt ami szuperfeloldáshoz vezet [32]. Ez a módszer körülményesen alkalmazható pl. biológiai mintákra, de szuperfeloldást eredményez hagyományos képalkotó eszközök esetén a kivilágító nyaláb polarizációjának előnyös megválasztása is.

2.6.1 Polarizáció hatása optikai mikroszkóp feloldására

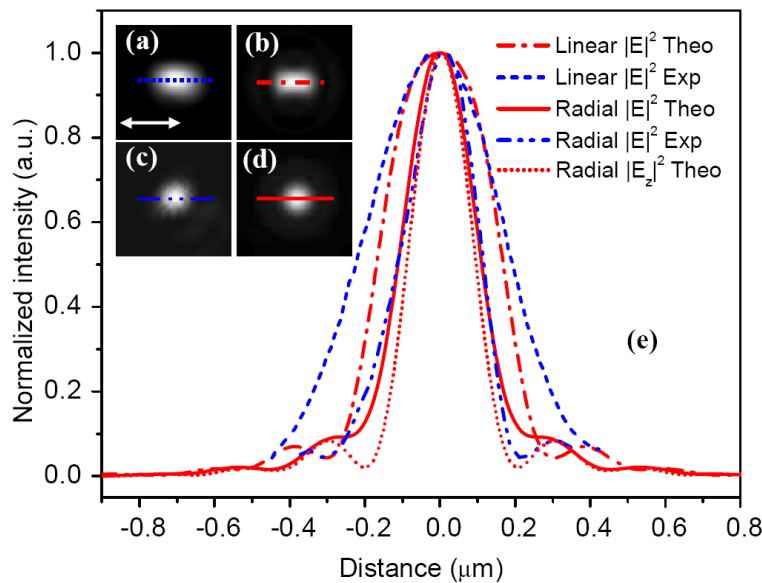
Egy fényhullámot kibocsátó dipól mérete kisebb, mint a kisugárzott fény hullámhossza. Mivel a Maxwell egyenletek időben reverzibilisek, jogos a feltevés, hogy egy a forrástól távolodó hullámfrontot megfordítva, az origóban lévő dipól felé terjedő és összetartó hullám kiterjedése az origóban összevethető a dipól kiterjedésével, ami látszólag ellent mond a Rayleigh-féle feloldási korlátnak. Valójában nincs ellentmondás, mert ahhoz hogy a hullám mérete az atomi tartományba essen, az szükséges hogy, a dipól és az általa létrehozott evanescens mező valóban jelen legyen az origóban. Ennek megfelelően egy nagy numerikus apertúrájú optikával lefókuszált síkhullám minimális kiterjedését a fókuszban akkor éri el, ha ott az elektromágneses mező formája megegyezik a feltételezett dipól által kisugárzott mező eloszlásával (11. ábra). Nagy numerikus apertúra esetén ez érvényes az elektromágneses mező polarizációjának szögeloszlására is [33]. Általános esetben, a leképező rendszerek fókuszának polarizációs geometriája azonban különbözik ettől az ideális szögeloszlástól.



11. ábra: Sugárzó dipól intenzitáseloszlása [33]. A dipól saját tengelyére merőleges irányban emittál a legintenzívebben ahol a polarizáció vektor párhuzamos a tengellyel.

Lineárisan polarizált kivilágító nyaláb esetén azon nyalábok elektromos térerősség vektorai, melyek az optikai tengelyt tartalmazó, ám a polarizáció irányára merőleges síkban terjednek, a fókuszban tökéletesen összeadódnak. Ugyanez nem igaz a polarizáció irányával párhuzamos síkra, ahol az egyes térerősség komponensek részlegesen kioltják egymást. Ez a fókuszban egy elnyúlt geometriájú intenzitáseloszláshoz vezet. Ezzel ellentétben radiálisan polarizált nyaláb esetén az elektromos térerősség vektor transzverzális összetevői a fókuszban tökéletesen kioltják egymást, így ott csak a longitudinális tag marad, melynek laterális kiterjedése kisebb, mint a lineárisan polarizált kivilágító nyaláb esetén.

A fentiekől eltérő, különböző irányban polarizált kivilágító nyalábot alkalmazva a fókuszbeli intenzitás-eloszlás szabadon variálható [34],[35]. A legjobb laterális feloldást biztosító geometria az ún. radiális tórusz eloszlás [36],[37]. Az így létrehozott fókuszolt axiális és laterális metszetei láthatóak a 12. ábrán, lineárisan polarizált kivilágítással összehasonlítva.



12. ábra: Fókuszolt intenzitáseloszlása lineáris és radiálisan polarizált nyaláb esetén [36]. Mért (a.) és számolt (b.) intenzitáseloszlás lineárisan polarizált kivilágító nyaláb esetén. Mért (c.) és számolt (d.) intenzitáseloszlás radiálisan polarizált kivilágító nyaláb esetén. Laterális és axiális metszetek (e.) Exp: mért, Theo: számolt.

2.6.2. Radiálisan polarizált nyaláb előállítása

Az előzőekben ismertetett előnyei miatt a radiálisan és vele együtt az azimutálisan poláros nyalábok előállítása és felhasználása kiemelkedően fontos mind a mikroszkópia mind a mikrolitográfia számára. Összefoglaló néven hengeres szimmetriájú vektornyalábok létrehozására számos módszer található a szakirodalomban.

Ilyen eljárás két egymásra merőleges polarizációs irányú nyaláb koherens összegzése, ahol a nyalábok egy Mach-Zender interferométerben ellentétes irányú spirális fáziskésést szenvednek, majd egy másik ilyen interferométerben a két nyaláb összeadódik [38]. Hasonló eljárás ismételhető meg lézer rezonátoron belül, ahol egymásra merőleges polarizációjú TEM_{01} módusok interferenciája hozza létre a radiális szimmetriát [39]. A fentitől eltérő megoldás olyan rendszer használata, mely a beeső fény adott irányú polarizációjából választja ki a megfelelő radiális, vagy azimutális tagokat. Az ilyen rendszerek speciális polarizátorként működnek (**R**adial **A**xial **P**olarizer, RAP). A legegyszerűbb esetben egy kör alakú foglalatba illesztett, transzparens $\lambda/2$ lemez cikkek transzformálják a beeső fény lineáris polarizációját radiálissá [40]. Az így létrehozott nyaláb minőségét azonban limitálja a használt lemezek száma. Elfogadható felbontású radiálisan vagy azimutálisan polarizált nyaláb azonban előállítható folyadék kristályos fázismodulátorokkal [41], vagy úgynevezett SLM-mel (**S**patial **L**ight **M**odulator). Kónikus felületű optikai elemek úgy, mint kónikus tükörpárok [42], polarizációs-rács axiconok [43] vagy Brewster szögben csiszolt axiconok [44] szintén alkalmasak axiális szimmetriájú polarizáció kiválasztására. Utóbbi esetén azonban a széles csúcsszög (kvarc: 112°) előállítása jelentős nehézség.

Axiális szimmetria előállítható úgy is, hogy lineárisan poláros fényt megfelelő irányú optikai tengellyel rendelkező, kettőstörő lemezen átfókuszálunk. Ez a módszer a fenti megoldások többségéhez képest egyszerűen megvalósítható és a szükséges optikai elemek kereskedelmi forgalomban kaphatók.

3. Célkitűzések

Az optikai tartományban, a tomográfiában alkalmazott képrekonstrukció elvén működő mikroszkóp (TOM) elméleti vizsgálata és kísérleti megvalósítása:

1. **Az optikai tartományban, a tomográfiában alkalmazott képrekonstrukció elvén működő mikroszkóp (TOM) által rögzített, rekonstruált képek minőségének vizsgálata a rekonstrukció paramétereinek függvényében.** Numerikus modell segítségével megállapítom, hogyan befolyásolja a kapott kép részletességét a projekciók finomsága és azok száma.
2. **A TOM tervezése és megépítése transzmissziós üzemmódban.** A mikroszkóp optikai tulajdonságainak, pl. a térbeli feloldóképességének meghatározása.
3. A TOM képalkotása során használt nyalábforgató mechanika tengelyhibája jelentősen csökkentheti a rekonstruált kép minőségét. **Javaslatot teszek a tengelyhibából származó képminőség romlásának javítására.**
4. **TOM feloldóképességének megállapítása reflexiós üzemmód esetén. A feloldóképesség összehasonlítása konfokális pásztázó mikroszkóp felbontásával.**

Intenzitásprofil manipulálása kettőstörő lemezzel:

5. **Kettőstörő lemezen történő átfókuszálásnál az ordinárius és extraordinárius fókuszok szeparált gerjesztésének vizsgálata, sugárkövető modell segítségével.** Megállapítom, hogyan függ a fókuszszeparáció a kivilágító nyaláb polarizációjától és a használt optika típusától.
6. **Radiálisan és azimutálisan polarizált nyaláb előállítása kettőstörő lemez segítségével.** A nyalábminőség elméleti és kísérleti vizsgálata a kivilágítás polarizációjának függvényében.

4. Tudományos eredmények

A következő fejezetben részletesen ismertetem a kitűzött célok megvalósítására fejlesztett mikroszkópot, valamint polarizátort. Numerikus szimulációkkal és kísérleti mérésekkel vizsgálom ezen eszközök paramétereinek működésükre gyakorolt hatását.

4.1 Tomográfiás optikai mikroszkóp (TOM)

A 2.1 fejezetben szerepelő (2.2) és (2.3) összefüggések megadják, hogy egy optikai rendszer milyen paraméterek mellett tud két, egymástól Δx távolságra lévő, pontszerű fényforrást megkülönböztetni. Ez a távolság elsősorban a kivilágító fény hullámhosszától és a rendszer numerikus apertúrájától függ. Ezek az összefüggések azonban akkor érvényesek, ha a két pontszerű fényforrás egyidejűleg sugároz. Mivel a dipólok általános esetben valamilyen gerjesztő fény hatására sugároznak, tegyük fel, hogy adott időpontban csak az egyik dipólt gerjesztjük, majd a képsíkban detektáljuk a hozzá tartozó intenzitást. A következő időpontban ezt megismételhetjük a másik dipóltra, így a két dipólmomentum tökéletesen megkülönböztethető az egymáshoz viszonyított távolságuktól függetlenül [6]. A képalkotó rendszerek feloldására korábban megadott kritérium esetén feltételeztük, hogy a minta felületén lévő összes pont egy időben sugároz. A valóságban azonban a kivilágító fénynek, azaz a gerjesztő forrásnak a kiterjedése véges, ami azt szabja meg, hogy mekkora távolságon belül gerjeszthető két dipól egyidejűleg. Ennek értelmében a feloldási kritérium függvénye a gerjesztő mező téreloszlásának is. Általános fény-anyag kölcsönhatást feltételezve a tárgy egy adott dipólmomentuma:

$$\mu_i = f\{\text{anyagi tulajdonságok}, \mathbf{E}_{gerj.}(\mathbf{r}_s - \mathbf{r}_i)\} \quad (4.1)$$

ahol $\mathbf{E}_{gerj.}$ a gerjesztő mező elektromos térerőssége, \mathbf{r}_i a dipólhoz tartozó helyvektor és \mathbf{r}_s a gerjesztő mező középpontjához tartozó helyvektor. Ez utóbbi változik, ahogy a gerjesztő mező letapogatja a tárgysíkot, szelektíven gerjesztve az egyes dipólokat. A fentiek alapján a rendszer PSF-jét a gerjesztő mező alakján túl az adott tárgyra jellemző fény-anyag kölcsönhatás is megszabja. Általános, nem lineáris kölcsönhatást feltételezve a képsík adott \mathbf{r} pontjában kialakuló elektromos mezőt a következő összefüggés írja le:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_s, \mathbf{r}_i; i\omega) = \frac{i\omega^2}{\epsilon_0 c^2} \tilde{\mathbf{G}}_{PSF}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_i; i\omega) \cdot \mu_i(i\omega, \mathbf{r}_s, \mathbf{r}_i), \quad (4.2)$$

ahol $\tilde{\mathbf{G}}_{PSF}$ az i -dik dipól diadikus pontátviteli függvénye, míg ω a kivilágító fény frekvenciája. Több dipólmomentum esetén a (4.2) jobb oldalát összegezni kell a momentumok számára. A

fenti meggondolásokat egy optikai mikroszkópra alkalmazva egy adott tárgyon, tetszőlegesen kis Δx távolságban lévő pontok megkülönböztethetőek, ha Δx -nél kisebb kiterjedésű gerjesztő vagy lokálisan elnyelő mezőt tudunk létrehozni. Ez megvalósítható úgy, hogy a vizsgált mintát kivilágító fényt részlegesen kitakarjuk és mérjük a minta gerjesztett dipóljai által kisugárzott mező intenzitását, azaz a mintáról visszaverődő, vagy transzparens minta esetén az azon áthaladó összintenzitást. A kitakarás mértékét növelve a minta egyes dipóljai már nem gerjesztődnek, így a detektált fényintenzitás is kisebb lesz. Ha a gerjesztetlen és a szomszédos gerjesztett dipólok térbeni eloszlásnak periódusa nagyobb, mint a kitakarás méretében bekövetkezett változás, akkor a dipólok helyzete pontosan megmondható az eltérő nagyságú kitakaráshoz tartozó, detektált intenzitás különbségéből.

Ezt a módszert alkalmazza a 4.1.2 fejezetben részletes leírásra kerülő TOM, mely transzmissziós üzemmódban egy tökéletesen át nem eresztő élet képez a vizsgált, transzparens minta felületére. Az él pozíciója a minta felszínével párhuzamos síkban finoman változtatható, így az adott pillanatban gerjesztett, majd árnyékoló pontok a mintán egy egyenes mentén helyezkednek el. Az él pozíciójához tartozó és a minta megvilágított régiójából érkező fényt fotodetektorral mérjük. Ahhoz, hogy a mintát alkotó pontok téreloszlását ne csak az élre merőleges irányban kapjuk meg, a kitakarás irányát és az árnyékoló él szögét változtatni kell, valamint mérni az így átjutó fény intenzitását. A nyert információ nem más, mint a vizsgált minta szinogramja, melyből a minta pontjainak teljes térbeni eloszlása a 2.4 fejezetben bemutatott szűrt-visszavetítés segítségével rekonstruálható.

A TOM használható oly módon, hogy a vizsgált minta vagy tárgy felszínét egy diffrakció limitált fénycsíkkal világítjuk ki. A reflektáló mintát a kivilágítás hosszirányára merőlegesen pásztázva és a visszavert fényintenzitást detektálva közvetlenül felvehető a minta szinogramja, melyből az előzőekben említett rekonstrukciós eljárással nyerhető kép. Ez az úgynevezett reflexiós üzemmód, ahol a kivilágító struktúrát a tárgy felületén kialakító optikai elem és visszavert fényintenzitást összegyűjtő optikai elem identikus. A rendszer felépítése és működése hasonlít a vonallal pásztázó konfokális mikroszkóphoz, de lényeges különbség, hogy ez utóbbi laterális feloldását limitálja a pásztázott felületről érkező fényt detektáló eszköz pixelmérete. A reflexiós TOM laterális feloldása ezért leginkább a ponttal pásztázó konfokális mikroszkópéval hasonlítható össze, melyre a későbbiekben kerül sor (lásd 4.1.3 fejezet).

Mivel a TOM képalkotásának minősége erősen függ az alkalmazott képrekonstruáló algoritmustól, a továbbiakban számolásokkal vizsgálom a szűrt-visszavetítéses módszer paramétereinek a keletkező kép részletgazdagságára, kontrasztjára és jel/zaj viszonyára tett

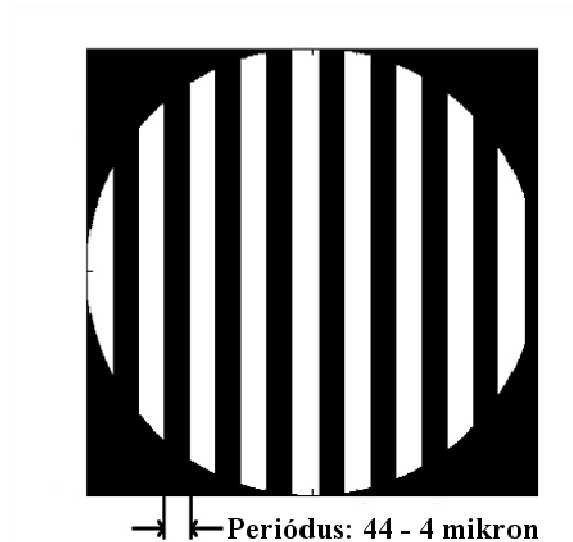
hatását. Ezt követően részletesen bemutatom a TOM transzmissziós és reflexiós üzemmódjait. Mérésekkel igazolom, hogy transzmissziós elrendezés esetén a tárgy fényjelének kellően finom modulációjával a rendszer feloldóképessége meghaladja a fényjelét összegyűjtő objektív numerikus apertúrájából eredő korlátot. Reflexiós esetben szintén mérésekkel igazolom, hogy a rendszer laterális feloldása meghaladja egy hagyományos konfokális mikroszkópét, amennyiben a használt objektív mindkét elrendezésben azonos.

4.1.1 Rekonstrukció paramétereinek hatása a rekonstruált kép minőségére

Mivel mind transzmissziós, mind reflexiós TOM esetén elsődleges célom a hagyományosan elérhető laterális feloldáshatár kiterjesztése volt, felmerült a kérdés, hogy a módszerben alkalmazott rekonstruáló algoritmus mekkora maximálisan elérhető feloldást és milyen várható képminőséget tesz lehetővé. Ennek vizsgálatára számításokat végeztem, melyek során előállítottam egy kijelölt irány mentén periodikus minta modelljének szinogramját, majd rekonstruált képét. A kapott képek minőségét hasonlítottam össze, miközben változtattam a rekonstrukciós eljárás paramétereit és a minta periódusát is.

Számolásaimhoz kezdetben a transzmissziós elrendezés méréseinél használt, periodikusan transzparens rács mintát választottam, melynek periódusa 4 és 44 mikrométer között változott. Mint az a 2.4.2 fejezetből következik, a kép információtartalma felbontható a kép különböző intenzitású pontjainak adott irányok menti modulációjára. Összetett kép esetén a teljes 360°-os szögtartományhoz tartozó irányok menti modulációt szükséges figyelembe venni a felbontáskor. Rács minta használata ilyen szempontból egyszerűsítés, mivel geometriájából adódóan csak egy kis szögtartományba eső irányok menti moduláció hordoz a rácsra jellemző információt. Ezt kihasználva egyszerűbb a különböző paraméterekkel indított rekonstrukciós eljárás hatását vizsgálni. A választott minta, avagy tárgy a 13. ábrán látható.

A számolások és a mérések során a már korábban ismertetett, szűrt-visszavetítéses (FBP) képrekonstruáló algoritmust használtam. Amint az eljárás leírásánál megmutattam, a módszer hatékonyságát a képalkotás során, a tárgyról készített szinogram részletessége szabja meg. Ezt két paraméter befolyásolja. Egyrészt a projekciót alkotó függvényértékek száma (n), másrészt a projekciók száma (m). Utóbbi az egyes projekciók iránya által bezárt szög ($\Delta\phi$) csökkentésével növelhető.

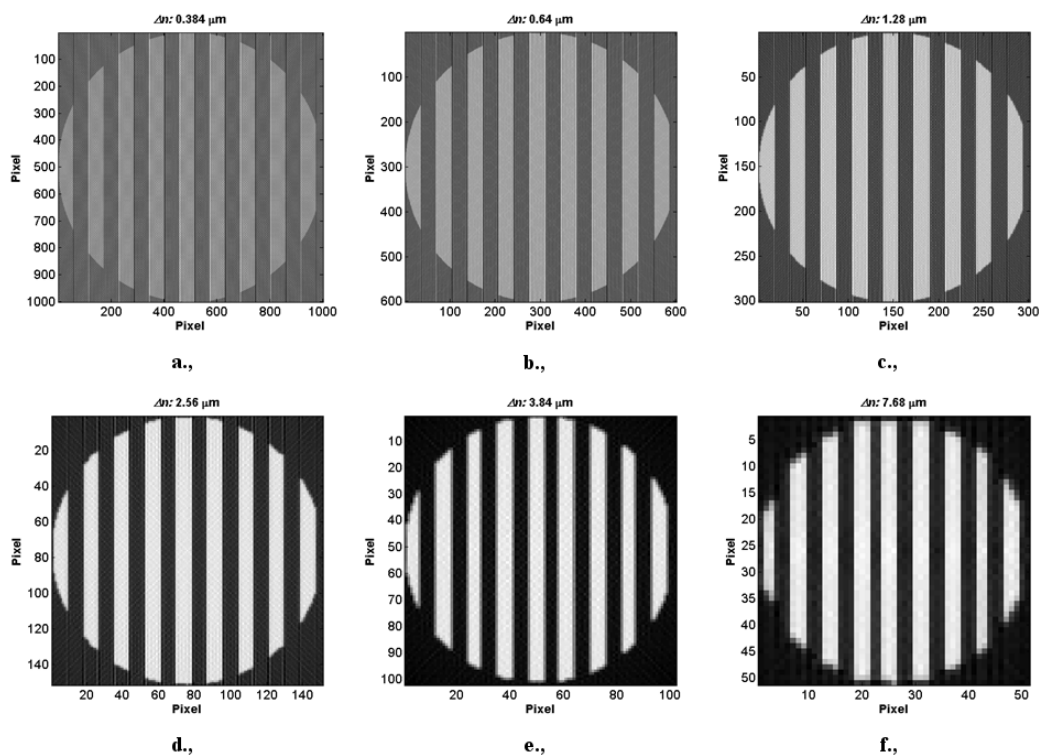


13. ábra: A számolásokhoz használt periodikus rács.

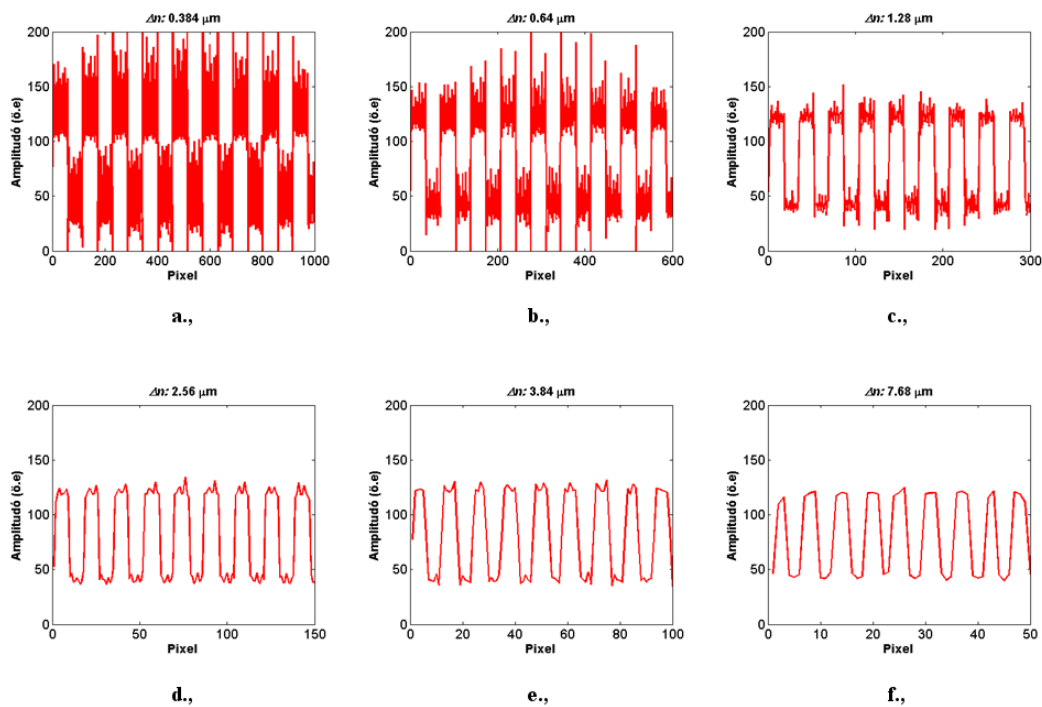
Képminőség az egyes projekciókat alkotó pontok számának függvényében

A rekonstruált kép egy pixelének értékét, a projekcióknak az adott képpont helyén felvett értékeinek összege adja, ahogy azt a (2.8) összefüggés leírja. Ha a rekonstruálni kívánt tárgy képének felbontását javítjuk, azaz a kép tartalmának arányait megőrizve megnöveljük a kép pixeleinek számát, majd végrehajtjuk a szűrt-visszavetítéses algoritmust, akkor ez ekvivalens azzal, hogy az egyes projekciók finomságát növeljük és így rekonstruálunk. Mivel a tárgy térbeli arányait megtartjuk, így tulajdonképpen a projekciót alkotó pixelek méretét (Δn) csökkentjük. A 14 ábrán látható, hogyan javul a $44\mu\text{m}$ periódusú minta rekonstruált képe, ha a projekciókat alkotó pontok számát egyre növeljük. A számolás során a tárgy méretének és a teljes látómezőnek ($384\mu\text{m} \times 384\mu\text{m}$) az arányát rögzítettem, míg a képet alkotó pixelek számát növeltem, így csökkentve a projekciókat alkotó pontok egymáshoz viszonyított távolságát. Mindegyik kép $\Delta\phi = 1^\circ$ -onként felvett projekciók visszavetítésével készült. A legkisebb Δn érték a teljes látómező ezred része, ebben az esetben a rekonstruált kép felbontása 1000×1000 pixel. A sorozatban ezt követi a 600×600 , 300×300 , 150×150 , 100×100 , valamint a legdurvább felosztás, 50×50 pixel. A minta periódusának és a periódusba eső képpontok számának az aránya a legjobb esetben $114 : 1$, míg a legrosszabb esetben $5,7 : 1$.

A képeket tekintve számottevő minőség romlás a 14.(e) és a 14.(f) ábrán látható, ilyenkor a projekciót alkotó szomszédos pontok távolsága, azaz egy pixel mérete, olyan nagy, hogy csak periódus hibával lehet a tárgyon látható modulációt rekonstruálni. A képeken látható rács szélei, azonban még jóval kisebb Δn esetén is elmosódtak, ez jól látható a 15. ábrán szereplő metszeteken.



14. ábra: A rekonstruált kép minősége a projekció részletességének függvényében; $\Delta n = 0,384\mu\text{m}$ (a.), $0,64\mu\text{m}$ (b.), $1,28\mu\text{m}$ (c.), $2,56\mu\text{m}$ (d.), $3,84\mu\text{m}$ (e.) és $7,68\mu\text{m}$ -es esetben.

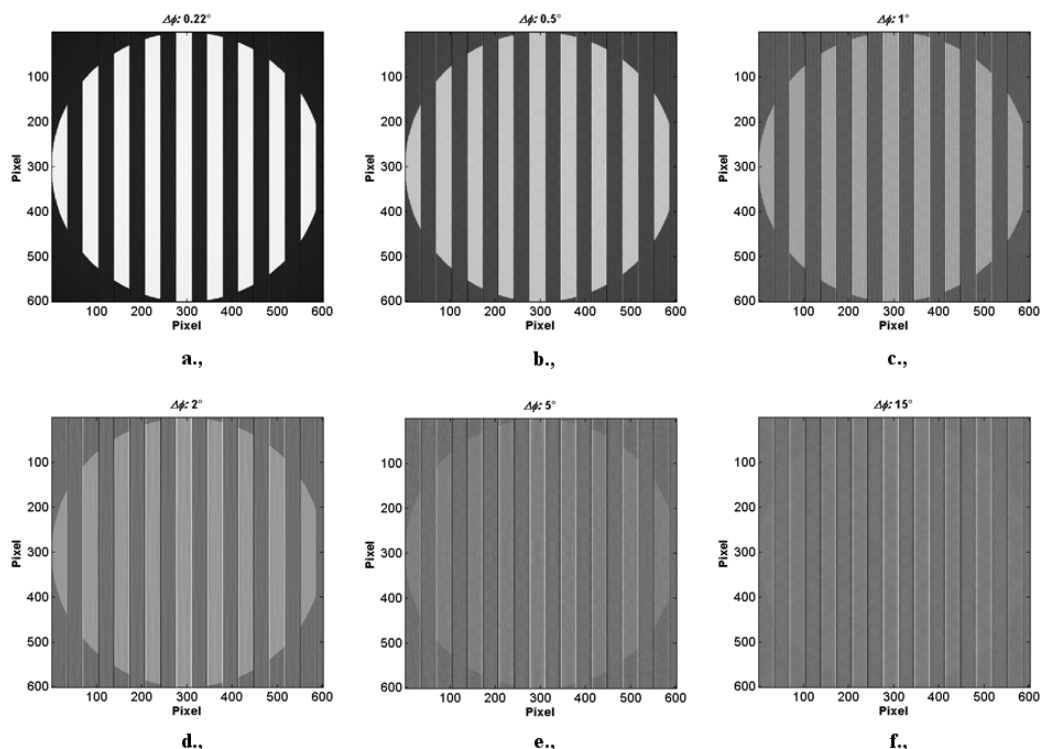


15. ábra: A rekonstruált képek sormetszei; $\Delta n = 0,384\mu\text{m}$ (a.), $0,64\mu\text{m}$ (b.), $1,28\mu\text{m}$ (c.), $2,56\mu\text{m}$ (d.), $3,84\mu\text{m}$ (e.) és $7,68\mu\text{m}$ -es esetben.

A metszeteken lévő négyszögjel felfutásának meredeksége, azaz a rácsvonalak széleinek kontrasztja romlik Δn növelésével, ami azzal magyarázható, hogy durva projekciók esetén a magas frekvenciájú Fourier komponensek kiesnek a rekonstrukció során. Erre utal a 15.(d) és 15.(e) metszeteken, a minimum és maximum helyek közepén látható bemélyedés. A 15.(f) metszeten már jelentős periódushiba is észlelhető. Ilyen nagy Δn értéknél már csak az alacsony frekvenciás komponensek dominálnak, így a rács metszete egy négyszögjel helyett inkább szinusz jellegű. Ha Δn kicsi, ahogyan a 15.(a), 15.(b) metszeteken, akkor a projekciókban a nagyfrekvenciás tagok száma megnő, ezért rácsvonalak szélei kellően kontrasztosak ugyan, de a kép zajos lesz. Ezt csak úgy lehet kiküszöbölni, hogy növeljük a projekciók számát, azaz csökkentjük $\Delta\phi$ értékét is. Összehasonlítva a 17.(a) és 17.(b) ábrát, látható hogy Δn -t változtatlanul hagyva és a szögelfordulás értékét csökkentve, valóban csökken a zaj mértéke. A kontraszt növelése és a zaj csökkentése a projekciók számának és részletességének egyidejű növelésével érhető csak el.

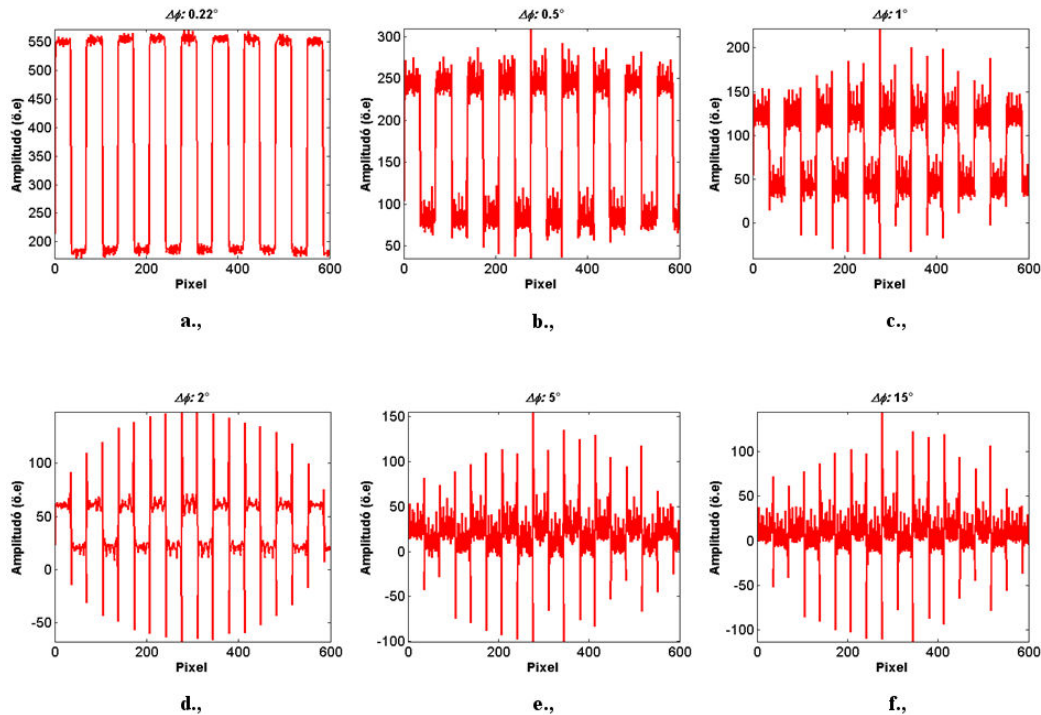
Képmínőség a felvett projekciók számának függvényében

A keletkező kép részletgazdagságát nem csak a projekciókat alkotó pontok száma szabja meg, hanem a projekcióknak a száma is. Ha a projekciók túl ritkák, azaz az általuk bezárt szög ($\Delta\phi$) túl nagy, akkor előfordulhat, hogy a tárgyon felelhető, adott irányú, moduláció két szomszédos projekció közé kerül, így a rekonstrukcióban elhanyagolhatóan kis súllyal szerepel. A tárgyként használt rácsok esetében, a visszavetített képen akkor jelenik meg helyesen a rács periódusa, ha a projekciók között minél több olyan irányú van, mely a rácsvonalakra merőleges egyenessel kis szöget zár be, azaz több projekció is információt hordoz a minta modulációjáról. Ideális esetben az egyik projekció iránya éppen egybeesik ezzel a kitüntetett egyenessel. Minél kisebb a rács periódusa, annál kisebb kell legyen $\Delta\phi$, hogy a fenti feltétel teljesüljön. A 16. ábrán látható képeken egy projekció iránya mindig merőleges a rácsvonalakra, így mind a hat esetben látható a helyes periódus ($44\mu\text{m}$), de a képek kontrasztját jelentős mértékben befolyásolja, hogy hány projekcióból állnak. Minden esetben 180° -os körbefordulással számoltam, mivel azonos egyenes mentén, de ellenkező irányban felvett projekciók értékei megegyeznek, ha az egyiket a forgásközéppontra tükrözzük.



16. ábra: A rekonstruált kép minősége, két szomszédos projekció által bezárt szög függvényében; $\Delta\phi = 0,22^\circ$ (a.), $0,5^\circ$ (b.), 1° (c.), 2° (d.), 5° (e.) és 15° -os esetben.

Mindegyik kép rekonstruálásához 600 pixelből álló projekciókat használtam. Míg a 16.(a) kép létrehozásában 800 projekció vett részt, addig a 16.(f) létrehozásában mindössze 12. A rekonstruált képek metszetei alapján (17. ábra) elmondható, hogy elfogadható kontrasztarány eléréséhez, a jelenlegi mintát tekintve, 1° alatti szögelfordulás szükséges, azaz a projekciók száma nagyobb kell legyen mint 180. Nagy szögelfordulás esetén a minimumok és maximumok közötti különbség lecsökken, ezáltal romlik a kontraszt. A 17.(c) – 17.(f) metszeteken, a rácsvonalak szélein felvett amplitúdó értékek jelentősen eltérnek a maximumok és minimumok átlagától, így egy hamis moduláció jelenik meg a 16. ábra képein. A 17.(d) metszet kontrasztját tekintve rosszabb ugyan, mint a több projekcióból készült 17.(b) és 17.(d), de kitöltöttsége mégis jobb. Ennek magyarázata feltehetően az, hogy bizonyos irányok mentén felvett projekciók értékei kisebb, a pixelértékek interpolálásánál keletkező, hibát tartalmaznak, mint más esetekben.

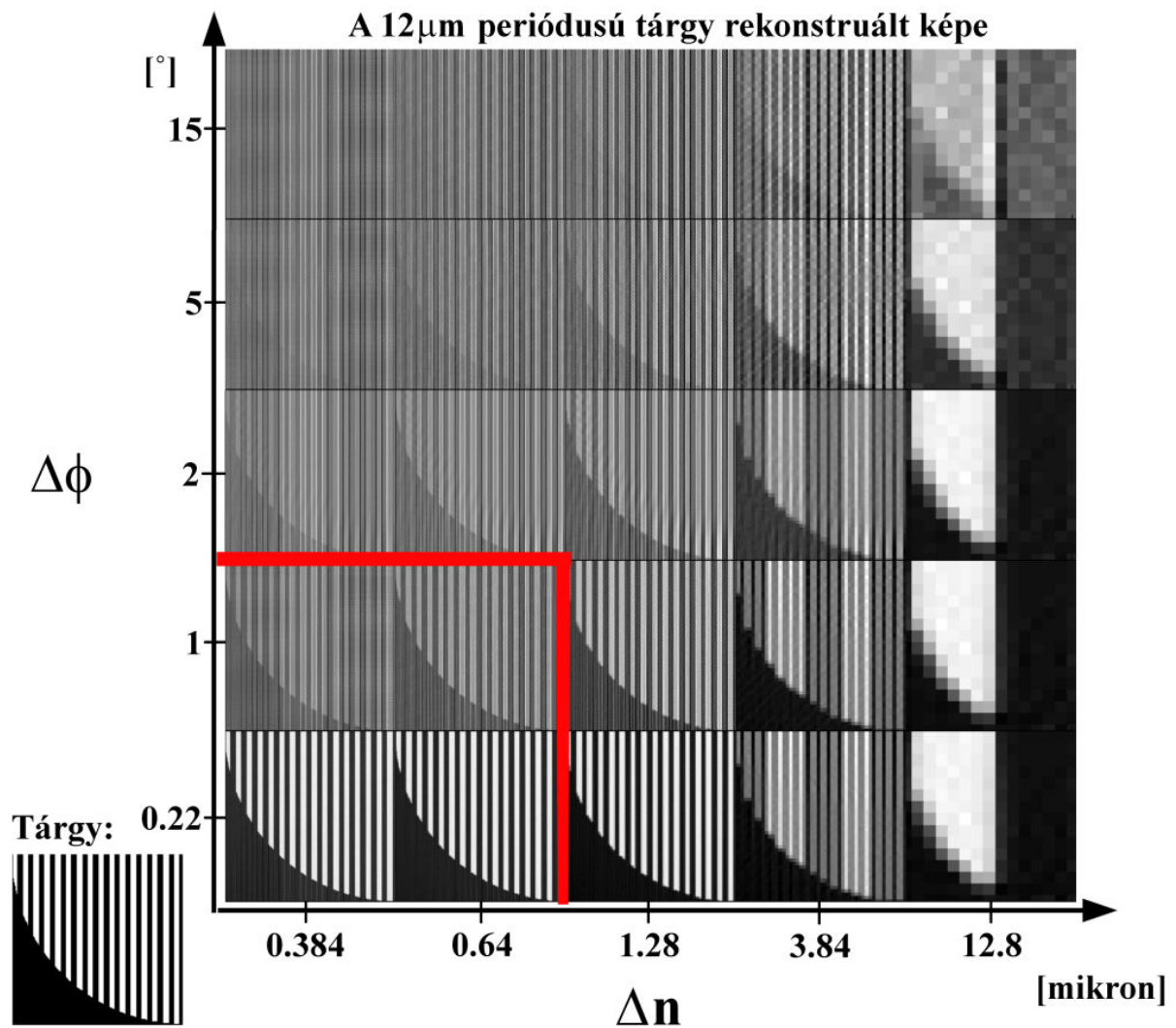


17. ábra: A rekonstruált képek sormetszezeit; $\Delta\phi = 0,22^\circ$ (a.), $0,5^\circ$ (b.), 1° (c.), 2° (d.), 5° (e.) és 15° -os esetben.

Rekonstrukció paramétereit a tárgyon fellelhető moduláció függvényében

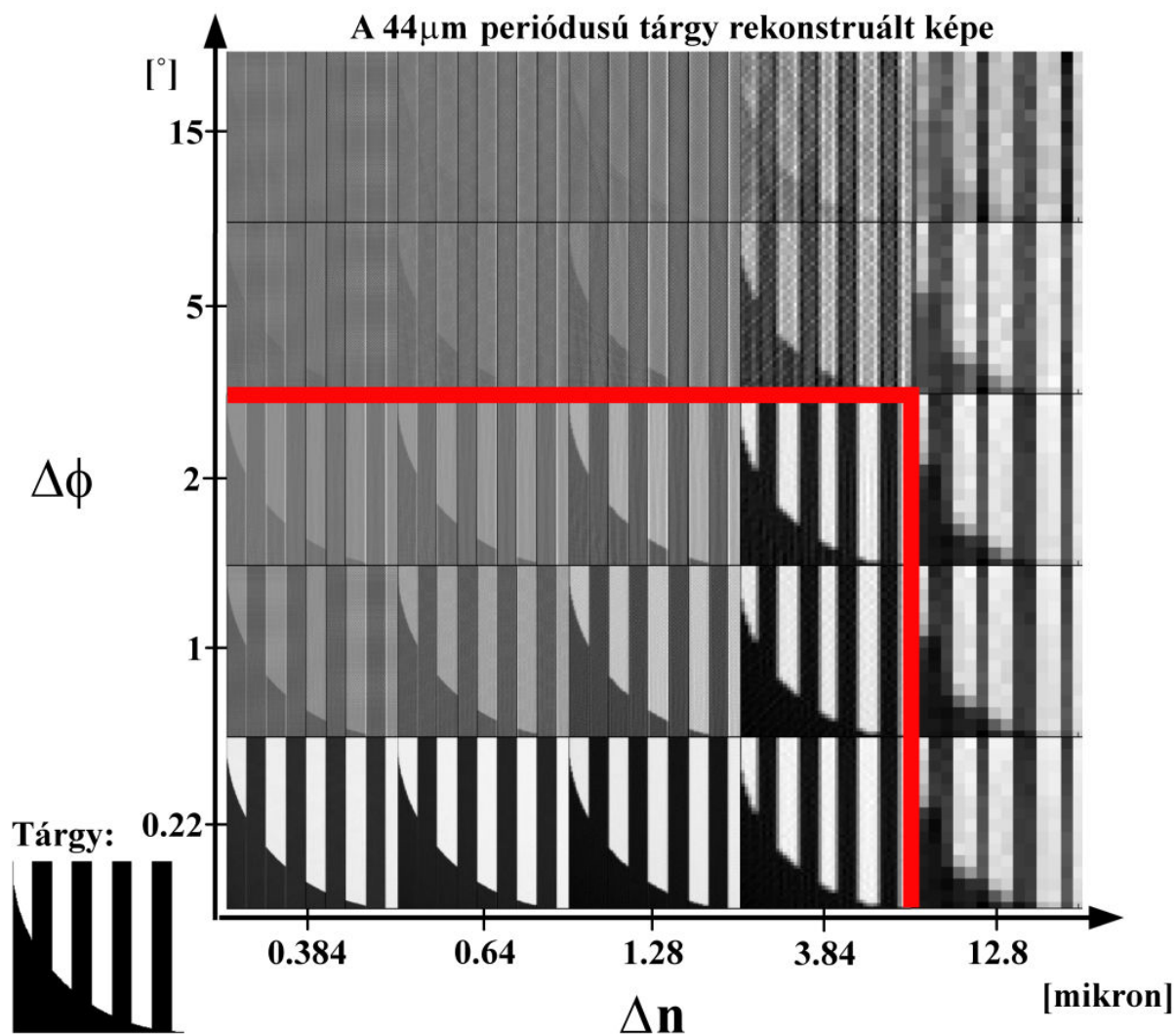
A szimuláció folyamán világossá vált, hogy a szűrt-visszavetítéses módszerrel rekonstruált képek minőségét a fent vizsgált két paraméter helyes megválasztása jelentősen befolyásolja. Ha a képen látható moduláció periódusa kicsi, akkor mind a projekciók számának, mind a projekciókat alkotó mintavételek számának kellően nagyoknak kell lenni, hogy az algoritmus a helyes képet állítsa elő. Azt, hogy milyen paraméterekkel kell rögzíteni egy tárgy szinogramját, azt magán a tárgyon látható moduláció finomsága adja meg. A 18. és 19. ábrákon látható, hogy két eltérő periódusú rács helyes rekonstrukciójához milyen Δn és $\Delta\phi$ párok a megfelelőek. A vörös vonal által határolt esetekben a tárgy képe még felismerhetően visszavetíthető, míg e határon kívül eső paraméterek használatával a rekonstruált képnek vagy a kontrasztja lesz gyenge, vagy a periódusa nem egyezik a tárgyával.

A rekonstruált képek kvantitatív kiértékelésére is lehetőség nyílik, ha bevezetünk több, a kép minőségét jellemző mennyiséget (pl. kontraszt, zajosság, élek felfutása, stb.). Ebben az esetben csak azok a rekonstruált képek kerülhetnének bele a vörös vonallal határolt „process window”-ba, melyek eleget tesznek az előre megadott minőségi követelményeknek. Ezen vizsgálat meghaladja jelen dolgozat célkitűzéseit, a folyamat jellege a vizuális kiértékelés alapján is jól szemléltethető.



18. ábra: 12μm periódusú rács rekonstruált képe, a szinogram paramétereinek függvényében.

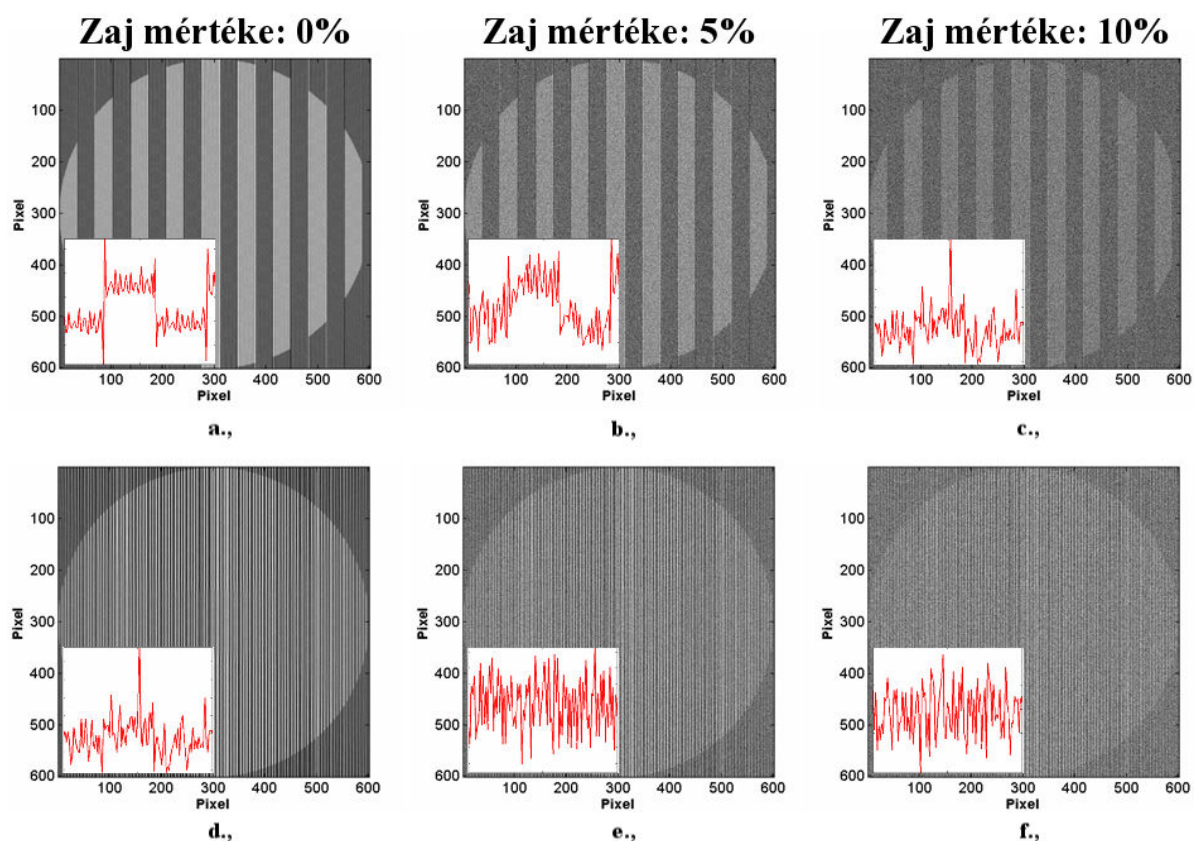
Az ábrák alapján elmondható, hogy a periódushiba nélküli rekonstrukció feltétele, hogy Δn értéke legfeljebb tízed akkora legyen, mint a rács modulációja. Ez a feltétel a később ismertetett kísérletek alatt csak a legkisebb periódusú rácsnál nem állt fenn, mivel nem tudtam a projekciók részletességét 0,64μm-nél nagyobbra növelni. A 18. ábrán, $\Delta n = 3,84\mu\text{m}$ esetén elkülöníthető egy másodlagos periódus megjelenése, melynek oka, hogy a projekció részletességének romlásával a mintavételi törvény már nem teljesül. Nagyobb periódusú rács esetén a szinogram állhat kevesebb projekcióból is, azaz $\Delta\phi$ értéke lehet nagyobb, mivel ilyenkor egy rácsvonalról közel azonos számú projekció hordoz információt, mint keskeny rácsvonal esetén, kis szögelfordulásnál. A nagy kontraszt eléréséhez azonban minden esetben nagyszámú projekció szükséges [45][46].



19. ábra: 44μm periódusú rács rekonstruált képe, a szinogram paramétereinek függvényében.

Mérési zaj hatása a képminőségre

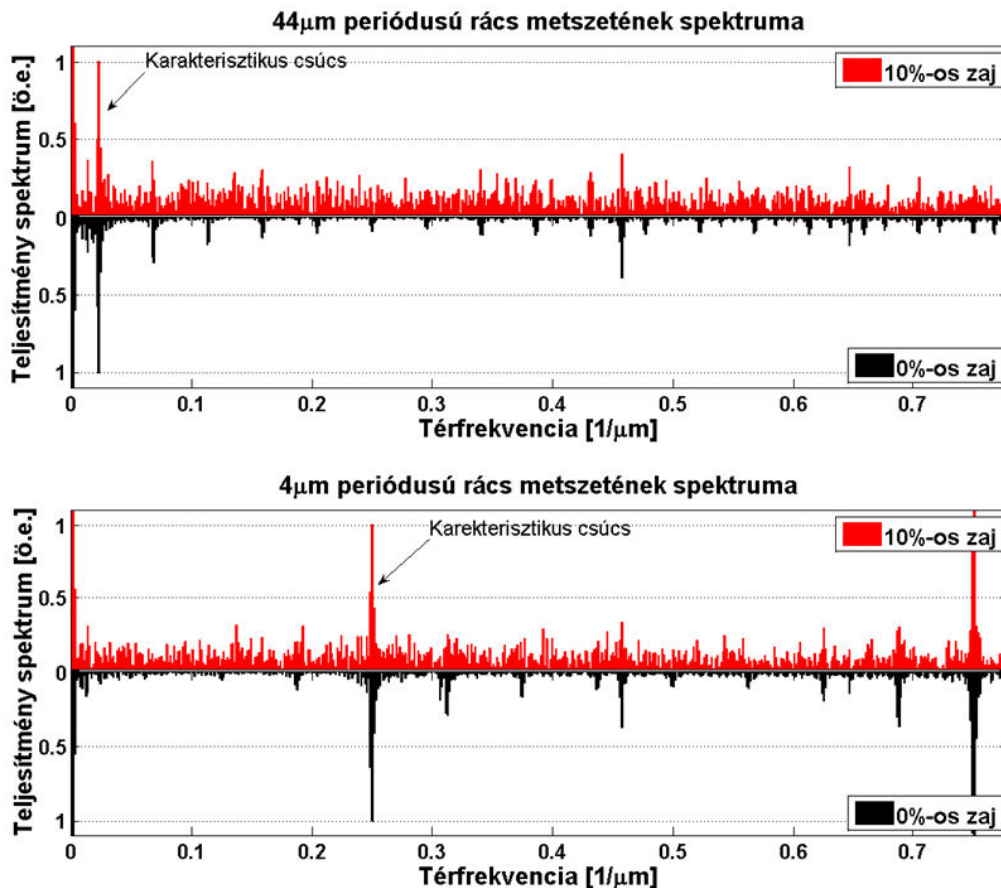
A szinogramok felvétele során elkerülhetetlen, hogy valamilyen mértékű mérési zaj ne adódjon az eredményekhez, mely hatással van a rekonstruált kép minőségére. A 20. ábrán egy 44μm (a.–c.) és egy 4μm (d.–e.) periódusú rács visszavetített képei láthatók, zaj nélkül, valamint 5% és 10%-os, egyenletes eloszlású zajjal terhelve. Az ábrákon látható képek $\Delta n = 0,64\mu\text{m}$ és $\Delta\phi = 0,22^\circ$ paraméterek mellett rögzített szinogramból lettek rekonstruálva. A képek egy adott tartományához tartozó keresztirányú metszetek alapján elmondható, hogy 10%-os zaj már jelentősen lerontja a keletkező kép kontrasztját, valamint a rekonstruált rács periódusában is hiba keletkezik. Ez leginkább a kis periódusú minta használatánál érzékelhető. A 4 μm-es rács esetén ez az eltérés 5% felett már számottevő.



20. ábra: 44 és 4 μ m periódusú rács rekonstruált képe 0% (**a.**) (**d.**), 5% (**b.**) (**e.**) és 10%-os (**c.**) (**f.**) egyenletes eloszlású zaj esetén.

A vizuális értékelésen túl érdemes megvizsgálni a rekonstruált képek horizontális metszetének térfrekvencia-spektrumát. A 21. ábrán a két különböző periódusú rács spektrumai láthatók zaj nélküli (fekete) és 10%-os mérési zajjal (piros) terhelt szinogramból rekonstruált esetben. Az adott rács periódusához tartozó karakterisztikus csúcs 10%-os zaj esetén is mindkét rácsnál jól elkülönül, így lehetőség van utólagos, mesterséges kontrasztjavításra, ami javít a keletkező kép minőségén. A karakterisztikus csúcshoz tartozó felharmonikusok nagyobb része olvad bele a zajba 4 μ m rácsperiódus esetén. Ennek következménye, hogy a világos és sötét felületek közti átmenet kiszélesedik és a rács éleinek felfutása szinuszos jellegű lesz. Ennek korrekciója összetett eloszlású kép esetén nem lehetséges.

A kísérletek során a mérési zaj szintjének lehető legalacsonyabb értéken tartására törekedtem, így az sosem haladta meg az 1%-ot, melynek következtében a mért, rekonstruált képek a fent említett hibáktól mentesek.



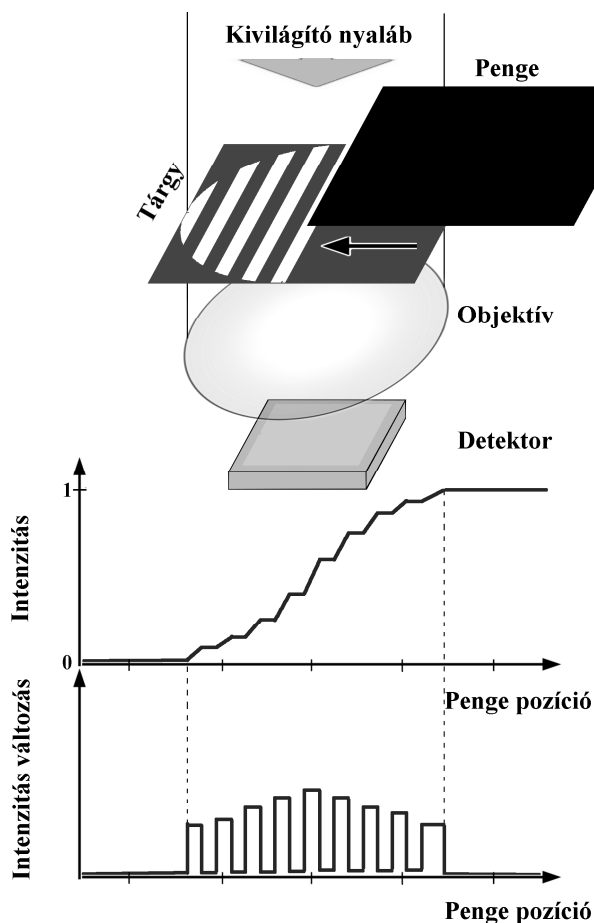
21. ábra: 44 és 4μm periódusú rács horizontális metszeteinek Fourier spektruma. A zajjal terhelt és a zaj nélküli spektrum is a karakterisztikus csúcsra van normálva.

4.1.2 TOM transzmissziós üzemmódban

A szimulációk eredményei megmutatták, hogy egy szűrt-visszavetítéses rekonstrukción alapuló képalkotó eszköz mely paraméterei befolyásolják a létrehozott kép minőségét. Mind Δn , mind $\Delta\phi$ a tárgy szinogramjának meghatározásakor játszik szerepet, mivel a rekonstrukció algoritmus (szűrt-visszavetítés) adott. A mérés során jelentkező zaj is a szinogramot terheli.

Az előzőeket figyelembe véve olyan mikroszkópot építettem, mely rögzíti a vizsgált, transzparens tárgy szinogramját és ez alapján rekonstruálja annak képét. Hasonló elven készít képet a CT, ami működése során, a tárgy egy szeletének szinogramját röntgensugarakból álló projekciókból állítja össze. Ebben az esetben a projekció értékét egy adott helyen a tárgy sugáráteresztő tulajdonsága adja meg. Az általam épített mikroszkóp esetén a projekció felvétel a 22. ábrán szemléltetett módon megy végbe. Az ábrán a tárgyat egy fénynyaláb világítja keresztül, melynek útjába egy éles szélű, nem-áteresztő objektumot (például pengét) fokozatosan, egy adott irányban betolunk. A transzparens tárgyon átjutó fényt egy

fotodetektorra fókuszáljuk, így a betakarás mértékének függvényében egy, a tárgyra jellemző intenzitáseloszlást kapunk.



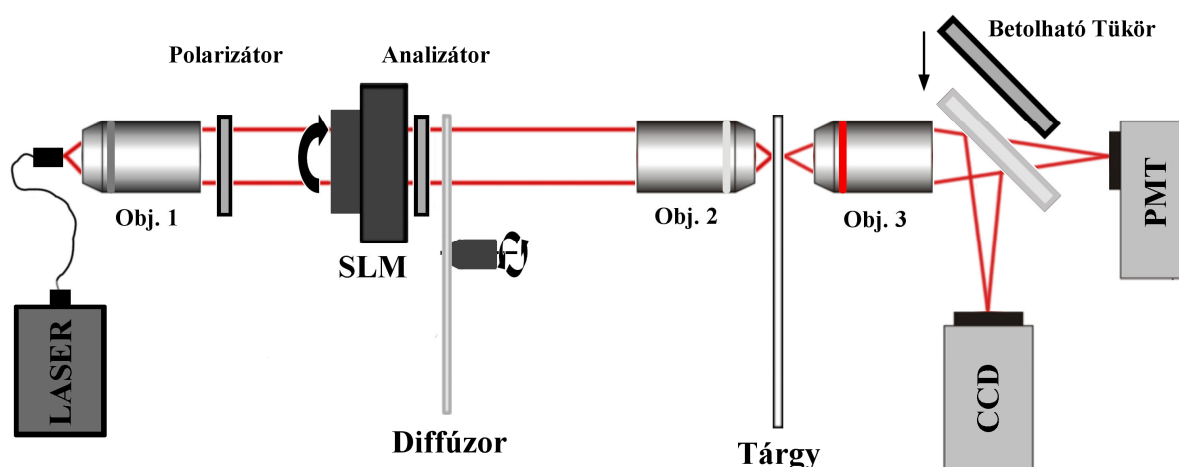
22. ábra: Projekció felvételének módja.

Ahol a tárgy fényáteresztő képessége kisebb, ott az intenzitásváltozás is kisebb lesz. Az ábrán látható rács esetén, ha a penge két, nem áteresztő rácsvonal között halad át, akkor a mért fényintenzitás csökken, ha a rácsvonalak felett mozog, akkor a mért intenzitás nem változik. Ha a felvett intenzitás görbét numerikusan deriváljuk, azaz megmondjuk, hogy a penge mozgása során hol, mekkora volt az intenzitásváltozás, akkor a tárgy egy adott irányú projekcióját kapjuk. Ha a penge mozgásának irányát a kivilágító nyalábra merőleges síkban $\Delta\phi$ szögenként 180° -ban elforgatjuk és minden egyes irányban megismétljük az intenzitásváltozás görbe felvételét, akkor a tárgy szinogramját kapjuk. A mérések során alkalmazott $\Delta\phi$ érték megegyezik a számolásoknál használt legkisebb szögelfordulás mértékével ($\Delta\phi = 0,22^\circ$). A másik, szinogram felbontását befolyásoló paraméter, Δn a penge egy elmozdulásának távolságát jelenti. Minél részletesebb képet szeretnénk a tárgyról, a pengét annál kisebb lépésekben kell a nyaláb útjába tolni. Mikroszkópról lévén szó, az eszköz feladata, hogy kis térbeli kiterjedésű tárgyakról alkosson jó minőségű képet. Ekkor azonban,

amint az a szimulációk eredményéből is látszik, a penge elmozdulásának nagysága töredéke kell legyen a tárgyon fellelhető legkisebb moduláció periódusának. Ahhoz, hogy ez teljesüljön, a kísérlet során a penge képét kicsinyítve, a tárgy felszínére képeztem. Fontos, hogy az elmozdulások mértéke minden pontban megegyezzen; ha a pengét mechanika segítségével mozgatjuk, akkor ez a feltétel megvalósítható mikrométeres nagyságrendben, de ennél kisebb léptékű, pontos elmozdulást csak a leképezés segítségével tudtunk elérni. Erre alkalmas eszköz az SLM (Spatial Light Modulator), ami egy olyan transzparens pixelmátrix, mely képes a rajta áthaladó, adott hullámhosszúságú fény polarizációjának irányát képpontonként, a pixelre adott feszültség függvényében elforgatni. SLM segítségével a kivilágító nyaláb amplitúdójának modulációja mechanikai mozgítás nélkül valósítható meg, ami növeli a rendszer stabilitását.

Kísérleti elrendezés

A kísérleteknél használt mikroszkóp felépítése a 23. ábrán látható. Fényforrásnak egy 660nm hullámhosszúságú, 10mW-os, hőmérséklet stabilizált, egymódusú optikai szálba csatolt, diódalézer használtam. A forrás által kibocsátott nyalábot egy Olympus típusú 0,25 numerikus apertúrájú objektívvel (Obj. 1) kollimáltam, majd polarizáltam. A polarizált nyaláb keresztülhaladt egy, az optikai tengelyre merőleges síkban forgatható, asztalra szerelt Holoeye LC 2002 SLM képernyőjén, amellyel lehetséges a nyaláb részeinek fázis, illetve amplitúdó modulációja.



23. ábra: Transzmissziós TOM kísérleti elrendezése.

Az SLM után a fényútba egy analizátort helyeztem, így tudtam a számítógép vezérelt eszköz segítségével a nyaláb amplitúdóját változtatni. Az analizátoron áthaladva a nyaláb egy

nagy sebességgel forgatható diffúz ernyőt világított ki. Ezen az ernyőn jelent meg a betakaráshoz szükséges penge képe, amit az SLM segítségével hoztam létre. Az SLM képernyője 800×600 pixelből áll, minden pixel mérete $32 \times 32 \mu\text{m}$, így a közel 2 cm átmérőjű nyalábot maximálisan 600 lépésben tudtam kitakarni. A diffúz ernyőn megjelenő penge képét egy Nikon gyártmányú 0,55 numerikus apertúrájú objektív (Obj. 2) segítségével kicsinyítettem le 1/50-ed részére és így képeztem a tárgy síkjára. Az ernyő forgatására azért volt szükség, mert a koherens nyalábbal kivilágított felületen zavaró szemcsézettség jelent meg, az úgynevezett „speckle” hatás. A diffúzort forgatva a szemcsék helyzete gyorsan változott, de a kép intenzitáseloszlása párszáz milliszekundumos nagyságrendben állandó maradt.

A fent leírtakat alkalmazva a penge éle és a tárgy egy síkba kerültek. Tárgyként a számolások alkalmával említett, litográfiai maszkon található, $44 - 4\mu\text{m}$ periódusú rácsokat használtam. A rácsokat a maszkra felvitt reflektáló réteg egyenközű eltávolításával hozták létre. A tárgyra képezett penge egy teljes betakarás során $384\mu\text{m}$ mozdult el, így két pozíció között $\Delta n = 0,64\mu\text{m}$ volt a távolság. A legnagyobb periódusú rács esetén így 70 lépés fedett le egy teljes periódust, míg a legkisebb rács esetén megközelítőleg hat. A betakarás irányát az SLM-et tartó forgatóasztal segítségével lehetett változtatni. Az eszközzel elérhető elfordulás mértéke $\Delta\phi = 0,22^\circ$ és annak többszörösei. Ezek az értékek megfelelnek azon paramétereknek melyekkel a szimulációknál feltüntetett 16.(a) és 17.(a), $44\mu\text{m}$ periódusú rács rekonstruált ábrái készültek.

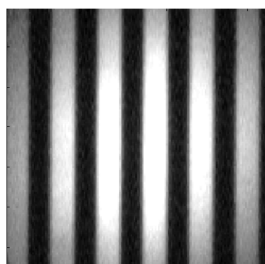
A tárgy síkján áthaladó fényt egy 0,1 numerikus apertúrájú Olympus objektív (Obj. 3) gyűjtötte össze és fókuszálta egy fotoelektron sokszorozó (PMT) belépő ablakára. A kísérletek során a PMT detektálta az egyes pengepozíciókhoz tartozó fényintenzitás változás mértékét. Mivel két egymást követő penge pozícióhoz tartozó intenzitás változás minimális értéke megközelítőleg $10\mu\text{W}$, ezért szükségessé vált a fotoelektron sokszorozó jelének felerősítése. Ehhez a fényforrás amplitúdóját 1 kHz környéki frekvenciával moduláltam, és a fényintenzitással arányos jelet Lock-In erősítővel felerősítettem. A harmadik objektív után, a fényútba betolható volt egy tükör, melynek segítségével a tárgy képét egy CCD kamera fényérzékeny rétegére lehetett képezni, ezáltal az eszköz hagyományos mikroszkópként is használható volt. A CCD kamera képét egy videó monitoron megjelenítve a minta pozicionálása és kép, valamint tárgytávolságok beállítása kényelmessé és gyorsan elvégezhetővé vált.

Az adatgyűjtést, az eszközöket vezérlését valamint a képrekonstrukciót egy általam fejlesztett PC szoftver végezte. A mérés során minden minta felvétele után rögzítettem a minta nélküli háttérrel is, azaz a kivilágító nyaláb intenzitás-eloszlását. Minden esetben a rekonstruált képét erre a háttérre normáltam.

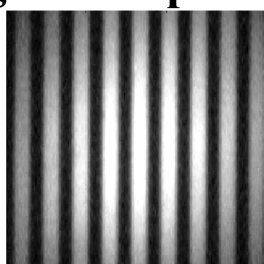
A mikroszkóp laterális feloldásának vizsgálata

Annak igazolására, hogy az ismertett eszköz feloldása nem függ a diffrakciótól, CCD felvételeket készítettem a tárgyról, a 23. ábrán látható négyszeres nagyítású, 0,1 numerikus apertúrájú objektív (Obj. 3) segítségével. Ezeket a képeket összehasonlítottam az eszköz által rekonstruáltakkal. A rekonstruált képek szinogramját minden esetben $\Delta\phi = 0,22^\circ$ -os lépésközzel és $\Delta n = 0,62\mu\text{m}$ penge elmozdulásokkal rögzítettem. Mivel a mintákon csak egyirányú moduláció volt, így a mérések során projekciókat csak a rácsvonalakra merőleges irányhoz képest $+5^\circ$ és -5° -ban vettem fel. Ennél nagyobb szöget bezáró projekciók ugyanis már nem hordoznak információt még a legnagyobb periódusú rács ($44\mu\text{m}$) esetén sem.

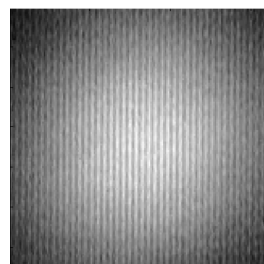
CCD kamerával rögzített képek



a.,

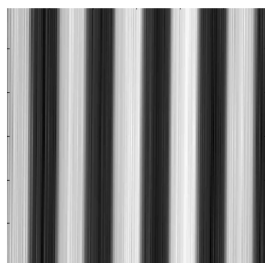


b.,

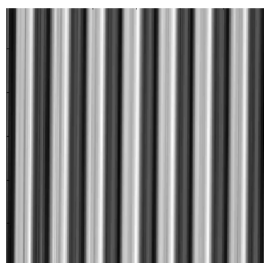


c.,

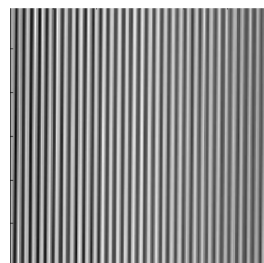
TOM felvétel



d.,



e.,

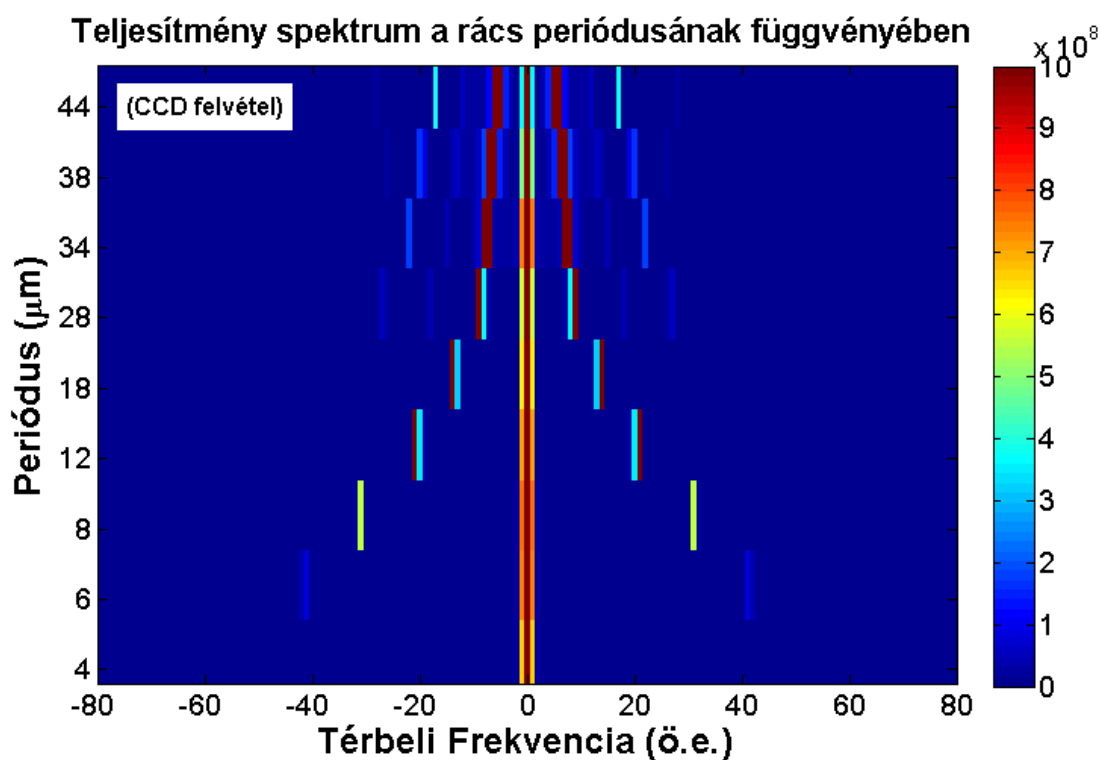


f.,

24. ábra: $44\mu\text{m}$ (a.)(d.), $28\mu\text{m}$ (b.)(e.) és $6\mu\text{m}$ (c.)(f.) periódusú rácsok CCD kamerával felvett és rekonstruált képei.

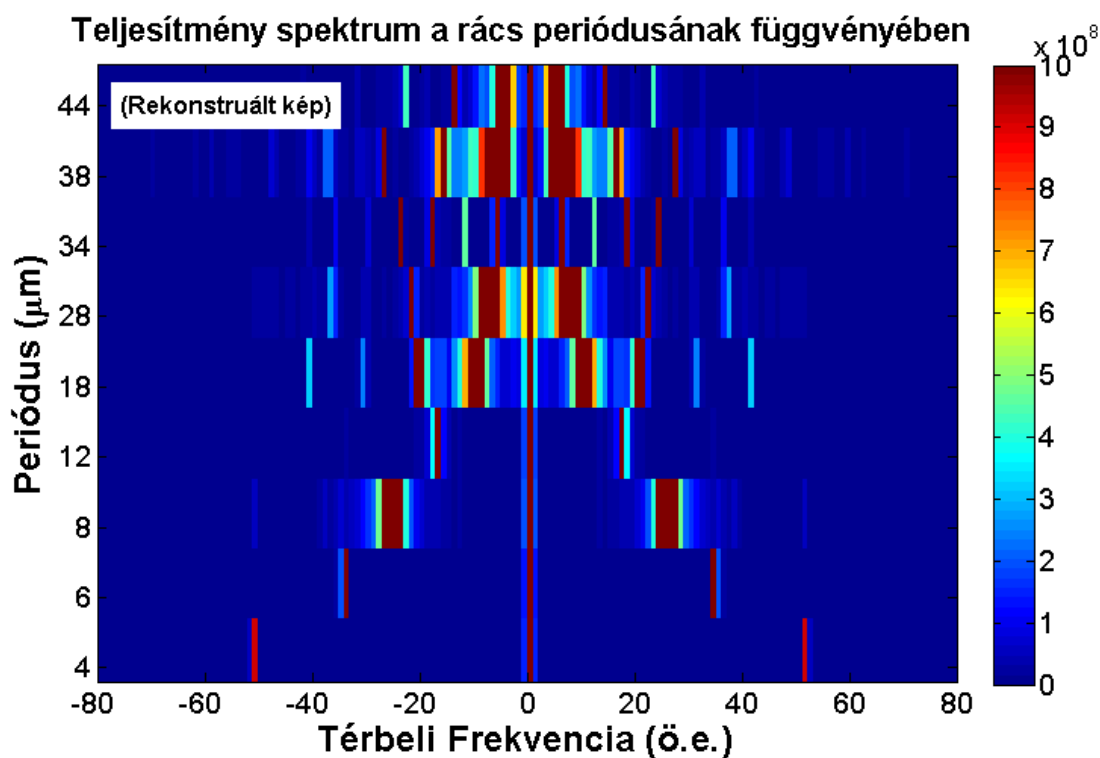
A 24. ábrán látható három különböző periódusú rácsnak a TOM által rekonstruált és kamerával rögzített képe. Az általam használt objektív a (2.2) formulából adódóan maximum $4,0\mu\text{m}$ periódusú, laterális modulációt képes feloldani, ha annak teljes numerikus apertúrája ki van használva. Ez azonban a kísérlet során nem teljesült, így a legkisebb periódusú rács, amit az objektív a CCD felvételek alapján felold, $6\mu\text{m}$ -nek adódott. A két különböző módon rögzített képek méretei nem egyeznek teljes mértékben, mivel a TOM látómezeje kisebb volt, mint az objektívé. A kamerával felvett képeken látható, hogy a háttér kivilágítása nem homogén, hanem Gauss intenzitáseloszlású, Ez a lézerdióda nyalábprofiljának köszönhető. A rekonstruált képeken nem látszik ez a háttér, mivel a visszavetítést végző algoritmus a háttérre normálta az egyes projekciókat.

A rekonstruált és objektívvel leképezett rácsok képminőségeinek összehasonlítására megvizsgáltam a képeken látható moduláció Fourier spektrumát, nevezetesen a teljesítmény spektrumok frekvencia komponenseinek számát és nagyságát. Ez a módszer alkalmas annak megmérésére, hogy a használt objektív és a TOM milyen jól viszi át a rács modulációját jellemző Fourier komponenseket, valamint megmérhető vele, az objektív feloldásának határa, hiszen ennél kisebb periódusú rács képének teljesítmény spektruma nem tartalmaz a 0 frekvencia komponensen kívül más tagokat.



25. ábra: A tárgyként használt rácsok CCD képének teljesítmény spektruma a rács periódusának függvényében.

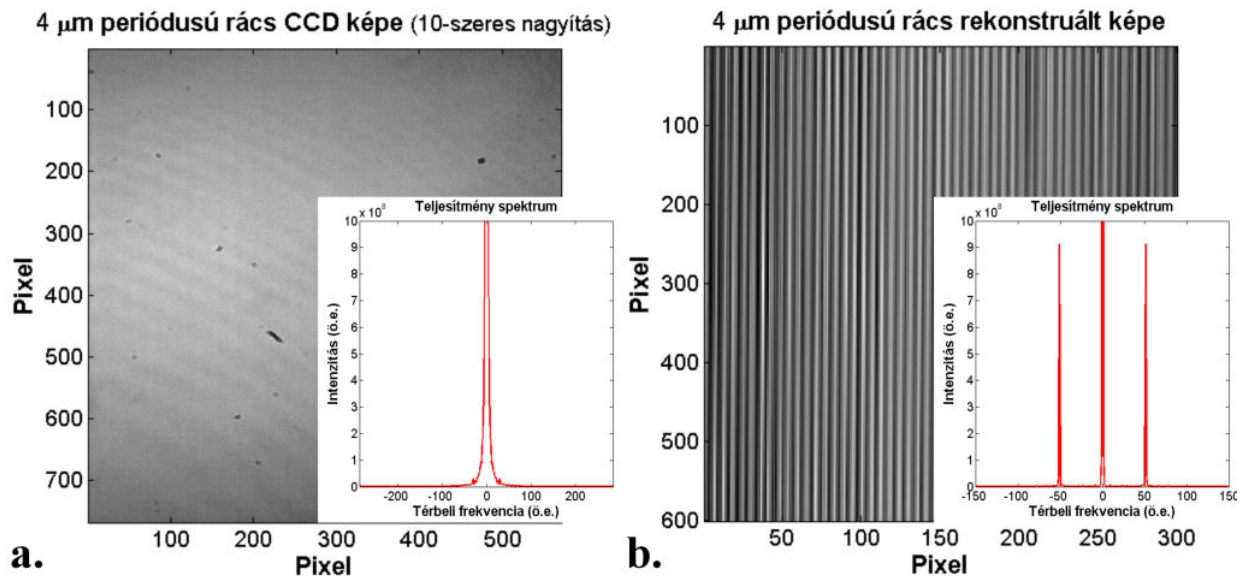
A képminőség meghatározására először CCD felvételeket készítettem a litográfiai mintán található teljes rácssorozatról, majd a rögzített képek sormetszeteit Fourier transzformáltam és az így kapott teljesítmény spektrumot ábrázoltam a rácsok periódusának függvényében. A 25. ábrán láthatók a mérés eredményei. Az ábrán lévő színskála felel meg spektrum teljesítmény értékeinek az egyes frekvenciákon. Látható, hogy minél nagyobb a rács periódusa, annál több frekvencia összetevő jelenik meg a spektrumban, ami azzal magyarázható, hogy az objektív modulációs transzfer értéke itt magas. Ahogyan csökken a periódus nagysága, az objektív egyre kevesebb Fourier komponenst képes átengedni, így romlik a rács képének minősége. Szembetűnő, hogy a $4\mu\text{m}$ periódusú rács spektrumából hiányoznak a modulációra jellemző frekvencia összetevők, az ilyen méretű rácsvonalakat ugyanis már képtelen feloldani az objektív.



26. ábra: A tárgyként használt rácsok TOM felvételének teljesítmény spektruma a rács periódusának függvényében.

Megvizsgáltam a TOM által készített felvételek teljesítmény spektrumát is és azt kaptam eredményül, hogy az így készült képek kis periódusú rácsoknál is több Fourier komponenst tartalmaznak, azaz a rács metszetére jellemző négyszögjel kisebb mértékben torzul. A 26. ábra mutatja, hogyan csökken ezen komponensek száma a periódus csökkentésével arányban. Azon túl, hogy további komponensek jelennek meg a spektrumban,

látható, hogy a meglévők kiszélesednek. Ennek oka a mérés során keletkező zaj hatása az egyes projekciókra és így közvetve a rekonstruált képre. Mint látható, a legkisebb periódusú rács esetén is megjelenik két másik Fourier komponens a 0 frekvenciás tagon túl, így elmondható, hogy a TOM-nak sikerült a $4\mu\text{m}$ periódusú rács modulációját visszaadni, szemben a hagyományos eszközzel. Ezt a 27.(b) ábrán látható rács képe és a teljesítmény spektrum is igazolja.



27. ábra: A $4\mu\text{m}$ periódusú rácsról készült, tovább nagyított CCD felvétel (a.) és a TOM által rekonstruált kép (b.), valamint a képek metszetének teljesítmény spektruma.

A 27.(a.) ábrán látható a legkisebb periódusú rácsról készült CCD felvétel, valamint a felvétel metszetének teljesítmény spektruma. Mivel az alkalmazott objektív négyszeres nagyítása mellett a rács periódusa $16\mu\text{m}$ -nek adódik, az objektív képét tovább ($10\times$) nagyítottam, hogy a CCD pixelmérete biztosan ne korlátozza a rendszer feloldását. Az ábrán nem észlelhető semmilyen moduláció, ahogyan azt a spektrum is megerősíti, mivel a további nagyítás ellenére a rendszer átvitelét a 0,1-es numerikus apertúrájú objektív limitálja. A fentiek alapján a következő állítások fogalmazhatóak meg:

- (1.) Egy hagyományos mikroszkóp információ átvitelének minősége csökken a mintán található moduláció frekvenciájának növekedésével, majd egy adott frekvenciahatáron túl, már semmilyen információt nem képes közvetíteni a tárgyról.
- (2.) Az általam ismertetett módszer segítségével lehetőség van ennek a frekvencia határnak a kitolására, úgy hogy közben a mintán lévő információból a lehető legtöbbet közvetítse a rendszer.

Mind a CCD, mind a TOM képek felvételénél a tárgyról a fényinformáció összegyűjtését ugyanaz az objektív végezte. A két leképezés folyamata által keletkezett képek minőségét összehasonlítva a rekonstrukció elve bizonyult hatásosnak. Az objektív által már nem feloldható mintát is sikerült ezzel a módszerrel rekonstruálni, így kijelenthetem, hogy a célkitűzésnek megfelelően bizonyítottam, hogy szűrt-visszavetítéses módszert használó tomográfiás optikai mikroszkóp feloldása a Rayleigh-féle feloldási kritérium értéke alatt van.

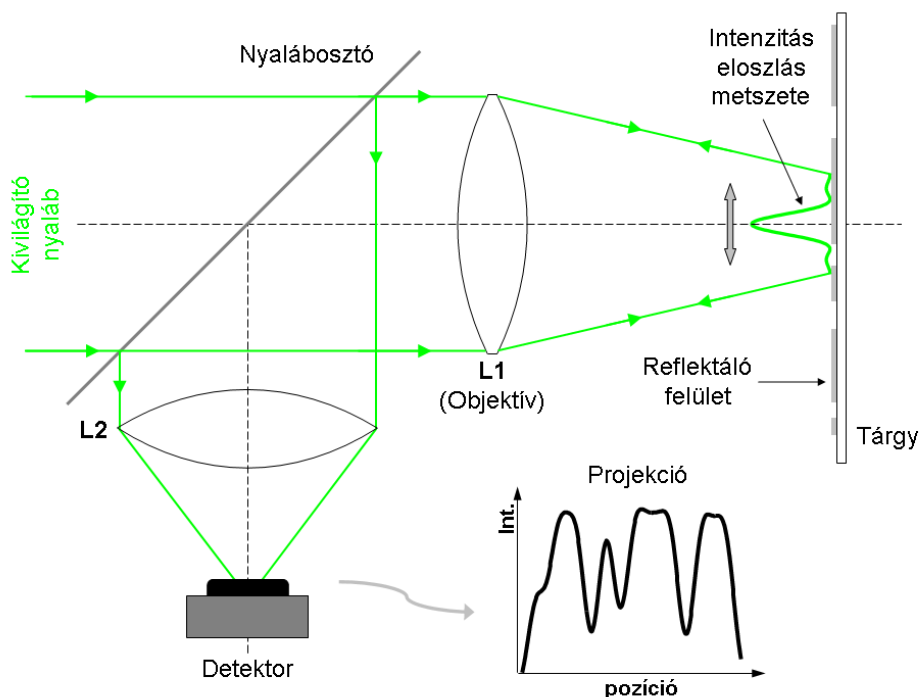
4.1.3 TOM reflexiós üzemmódban

Az előző fejezetben ismertetett TOM segítségével megmutattam, hogy a vizsgált minta egy speciális megvilágítása mellett a képalkotó rendszer feloldása függetleníthető az alkalmazott mikroszkóp objektív klasszikus értelemben vett feloldóképességétől. A bemutatott elrendezés azonban többnyire demonstrációs célra alkalmas, annak ipari felhasználásához a képalkotás sebességének és a rendszer stabilitásának növelése egyaránt szükséges. Transzmissziós TOM esetén a minta modulált kivilágításához egy mozgatható él kicsinyített képét vetítettem a minta síkjára, amihez egy nagy numerikus apertúrájú objektívet használtam. Ennek az objektívnek jóval nagyobb a feloldóképessége, mint a klasszikus képalkotásban és a szinogram felvételében szerepet játszó – 0,1 numerikus apertúrájú – társának. Így jogos lehet a kérdés, hogy mi értelme a módszer használatának egy gyenge feloldású objektívvel, ha rendelkezésünkre áll egy nagyobb teljesítményű mikroszkóp objektív. A transzmissziós elrendezés a módszer demonstrálására szolgál, segítségével megvizsgáltam, hogy a gyakorlatban hogyan érvényesülnek a szimulációk során, a szinogram paraméterire tett megállapítások. Bár a TOM képalkotó módszer hatékonysága független a mintát kivilágító struktúra létrehozásának módjától, egyik előnyös megvalósítása mégis az, ha a struktúrát egy optikai eszköz képezi, vagy fókuszálja a minta felszínére. Ezt az előnyt és a gyakorlati alkalmazhatóság szempontját is figyelembe véve átépítettem a rendszert oly módon, hogy a minta kivilágítása és a mintáról visszaverődő fényinformáció összegyűjtése ugyanazzal az objektívvel történjen.

Képalkotás folyamata, jellemzői

Reflexiós elrendezés esetén, a minta felszínén egy diffrakció limitált vékony csík jön létre, melynek vastagságát a használt objektív tulajdonsága és az alkalmazott hullámhossz szabja meg. Ezt a csíkot, a hosszára merőleges irányban pásztázva és a megvilágított tartományból visszaverődő fényintenzitást mérve kapjuk a vizsgált minta egy projekcióját. A diffrakció limitált csík használatával nincs szükség numerikus derivált előállítására, szemben a

transzmissziós mérésekkel. A projekciók felvételének vázlatos elvét mutatja be a 28. ábra. Diffrakció limitált esetben a mintát kivilágító intenzitáseloszlás keresztmetszete a (2.3) formulával írható le. A pásztázás során a minta jobban vagy kevésbé reflektáló részeiről az intenzitás egy meghatározott hányada visszaverődik és az optikai rendszeren keresztül a detektorba jut. Egy dimenziós esetben, a pásztázás egy adott helyzetéhez tartozó mért jel a beeső intenzitáseloszlás és a minta lokális reflexió eloszlása alatti területek szorzata. Az intenzitáseloszlást térben kiterjesztve és a pásztázási tartományt bejárva, a kapott projekció nem más, mint az objektív által létrehozott kétdimenziós eloszlás függvény és a minta kétdimenziós reflexiójának konvolúciója.



28. ábra: Projekció felvételének elve reflexiós TOM esetén.

A mintát vagy a fókuszban létrejövő intenzitáseloszlást az optikai tengely mentén elforgatva, majd a pásztázást az eloszlás hosszirányára merőlegesen megismételve megkapható a mintát leíró szinogram.

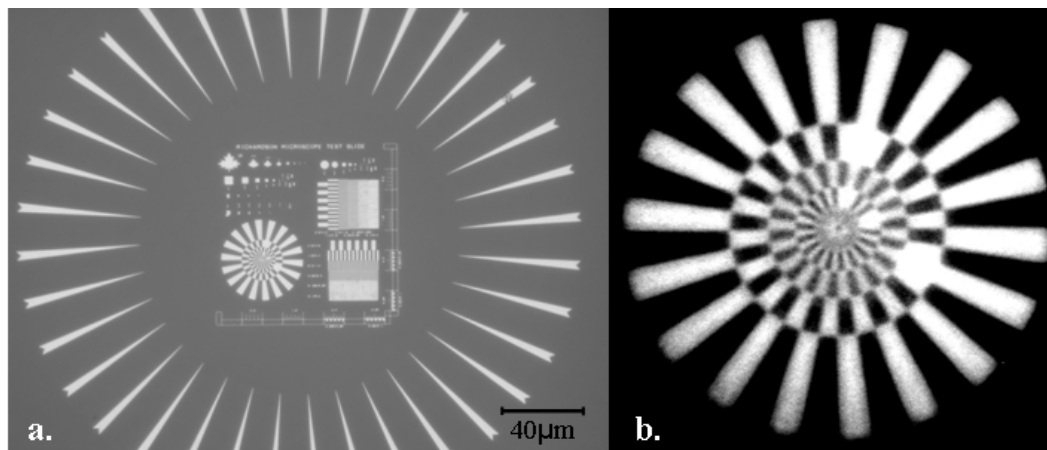
A reflexiós TOM képképzésének menete az ismert megoldások közül a pásztázó konfokális mikroszkóp elrendezéséhez áll a legközelebb. Az úgynevezett vonallal pásztázó konfokális elrendezés esetén a kivilágított objektív szintén egy diffrakció limitált csíkot hoz létre a minta felszínén, melynek pozíciója a képképzés során változik a mintához képest. Konfokális megoldásnál a detektor karban található egy rés, mely biztosítja a megnövekedett axiális feloldást. A rés reflexiós TOM esetén is használható, de ez a lehetőség a későbbiekben

kerül tárgyalásra. Lényeges különbség, hogy a vonallal pásztázó konfokális mikroszkópban fotodióda sor szükséges a pásztázott vonal menti információ visszanyeréséhez. A detektor pixeleinek mérete azonban korlátozza az elérhető legnagyobb laterális feloldást. Reflexiós TOM esetén csak egyetlen detektáló elem szükséges, mivel a laterális információt a rekonstrukciós algoritmus állítja elő. A reflexiós TOM laterális feloldását a detektor kiterjedése és struktúrája nem befolyásolja. Ez az állítás igaz a ponttal pásztázó konfokális mikroszkópra is, amely csík helyett diffrakció limitált, kör apertúrájú foltal tapogatja le a minta felszínét. Az eszköz laterális feloldását – akárcsak reflexiós TOM-nál – elsősorban a detektált hullámhossz és az alkalmazott optika numerikus apertúrája szabja meg, melyek együttesen korlátozzák a mintát kivilágító eloszlás legkisebb térbeni kiterjedését is. Azonos kivilágító és detektáló objektív esetén, ponttal pásztázó konfokális mikroszkópnál, ennek az eloszlásnak az átmérőjéből származik a legkisebb laterálisan feloldható méret. Ez az átmérő a (2.1) és (2.2) összefüggés értelmében $0,61 \cdot (\lambda/NA)$. A konfokális mikroszkóp laterális feloldása csak abban az esetben jobb mint az létrehozott eloszlás átmérője, ha a detektor ágban használt tülyuk átmérője 1 Airy egységnél kisebb [15]. Ekkor azonban a detektált jel aránya jelentősen lecsökken a zajhoz képest, ami a képminőség romlásához vezet. Reflexiós TOM laterális feloldását az egyes projekciók által hordozott információ limitálja. A projekciókban megjelenő legkisebb modulációnak a Fourier térben egy maximális frekvenciakomponens felel meg. A rekonstrukció során ez a frekvencia határ változatlan marad, így a keletkező képen megjelenő legkisebb moduláció a projekciókban felelhető legkisebb modulációból ered. Az egyes projekciókban a legkisebb modulációt a kivilágító, diffrakció limitált csík metszetének szélessége szabja meg, mely a (2.3) értelmében $0,5 \cdot (\lambda/NA)$. A fenti gondolatmenetnek megfelelően, megegyező hullámhossz és alkalmazott optika mellett a reflexiós TOM várható laterális feloldása meghaladhatja a ponttal pásztázó konfokális mikroszkópét, hiszen az abban alkalmazott tülyuk a gyakorlatban nem lehet infinitezimálisan kicsi. A továbbiakban ismertetett reflexiós TOM elrendezések képalkotó minőségének kvantitatív jellemzésén túl összehasonlítom azt egy kereskedelmi forgalomban kapható, ponttal pásztázó konfokális mikroszkóp képminőségével.

Képminőség jellemzésére használt minta: Richardson csillag

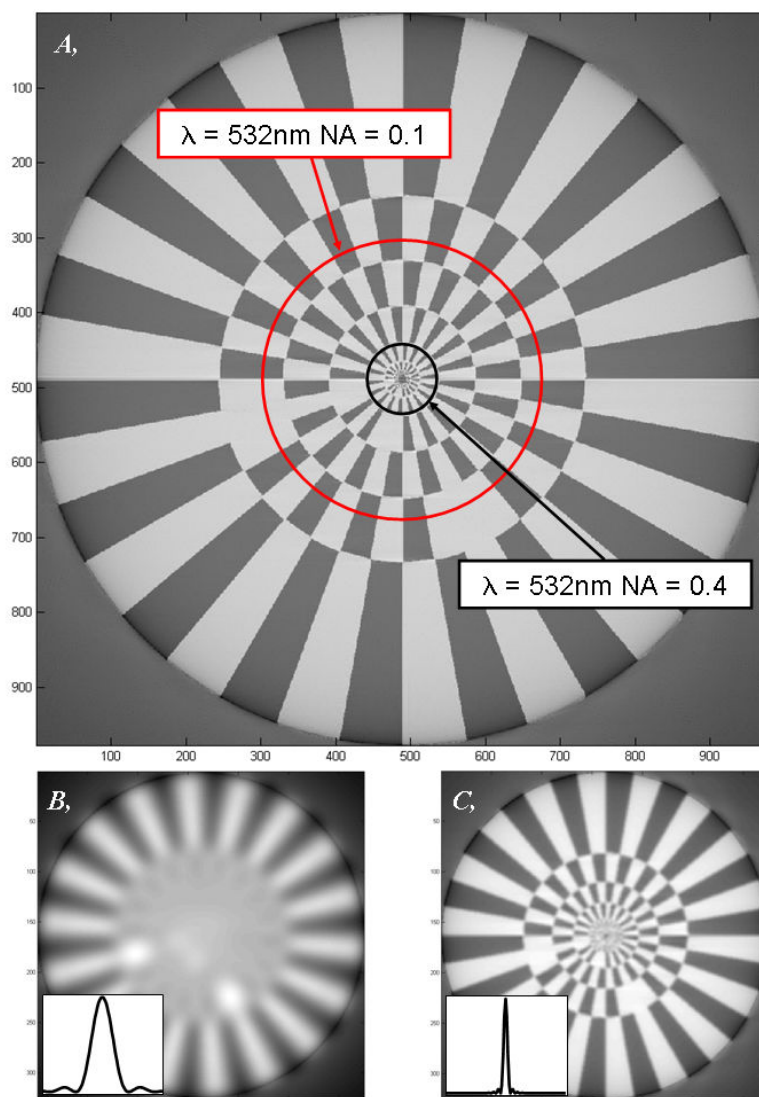
A transzmissziós TOM feloldásának vizsgálatára használt rács minta hátránya, hogy csak egy irány mentén hordoz modulációt. A mintát használva csak részleges ismeret nyerhető a TOM képalkotásának kvalitatív és kvantitatív jellemzőiről. Valós minták esetén kétdimenziós eloszlás vizsgálata a cél így ennek megfelelően a reflexiós TOM elrendezés jellemzése során

egy összetett, radiális szimmetriával rendelkező mintát használtam. Ez a minta egy mikroszkópok képminőségének mérésére alkalmas próbalemez (Richardson Test Slide) egy részlete, az úgynevezett Richardson csillag [47]. A teljes lemez és a csillag a 29. ábrán látható.



29. ábra: Richardson teszt lemez 100-szoros nagyítású optikai mikroszkóp alatt. (a.) Richardson csillag digitálisan felnagyított képe. (b.)

A struktúra kialakítása hasonló, mint a rácsot tartalmazó litográfiai maszk esetén; transzparens plánparalel lemezre erősen reflektáló fémréteg van párologtatva, melynek egy része periodikusan, elektronsugárral eltávolították. A csillag 7 gyűrűből áll, melyek egyenként 18 reflektáló és 18 áteresztő szeletet tartalmaznak. Kívülről a második, negyedik és hatodik gyűrűkben pozícionálásra alkalmas, három reflektáló szeletből álló jelölés található. A gyűrűk átmérője rendre 40, 20, 13, 8, 4, 2, 1,30 μm.



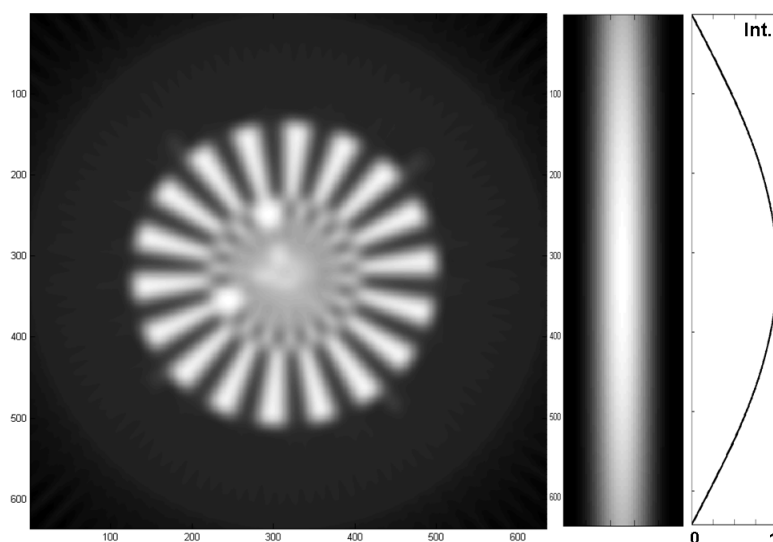
30. ábra: Richardson csillag szimulált rekonstrukciója (a.) $0,15\mu\text{m}$, (b.) $2,66\mu\text{m}$ és (c.) $0,665\mu\text{m}$ félértékszélességű LSF esetén.

Ahhoz, hogy a mintáról készült képeken a reflektáló és áteresztő szeletek modulációja még a csillag legkisebb gyűrűjében is kivehető legyen, a kivilágító intenzitás csík metszete nem lehet nagyobb 150nm -nél. Ahogyan a diffrakció limitált csík szélesebb lesz, – azaz nő a kivilágító hullámhossz, vagy csökken az alkalmazott numerikus apertúra – úgy tűnik el a szeletek modulációja a csillag közepétől a széle felé. A mintáról készített kép alapján a rendszer feloldóképessége meghatározható, ha vesszük azt a legkisebb sugarú kört, melynek kerülete mentén még látható moduláció és megmérjük a moduláció periódusának felét. Szimulációt készítettem annak szemléltetésére, hogyan alakul a csillag TOM képe a kivilágító optika NA-jának változásával. A 30. ábra (a.) része mutatja azt a rekonstruált esetet, ha a kivilágító csík vastagsága, azaz a rendszer LSF-je közel 150nm . A (b.) és (c.) képek bal alsó sarkában látható metszetek mutatják az egyes projekciók felvételénél használt LSF

keresztirányú intenzitáseloszlását. Ez az eloszlás az (a.) kép esetén egy pixel szélességű. A (b.) és (c.) kép felvétele során a hullámhosszat egységesnek ($\lambda=532\text{nm}$) vettem, míg a numerikus apertúrát rendre 0,1 és 0,4-nek választottam. Látható, hogy a NA csökkenésével nő a csillag közepén lévő homogén terület. Az (a.) képen különböző színnel feltüntetett koncentrikus körök jelölik azt a határt, melynél kisebb sugarú körök mentén – a Rayleigh-féle feloldási kritérium értelmében – már nem látható moduláció a két eltérő NA-jú objektív esetén. A (b.) és (c.) képeken az így kapott határkörökön belül már valóban nem látható a csillagra jellemző moduláció, bár a fokozatos kontrasztrómlás következtében a határkör szemmel nehezen megállapítható.

Kivilágítás hibáinak hatása a képminőségre

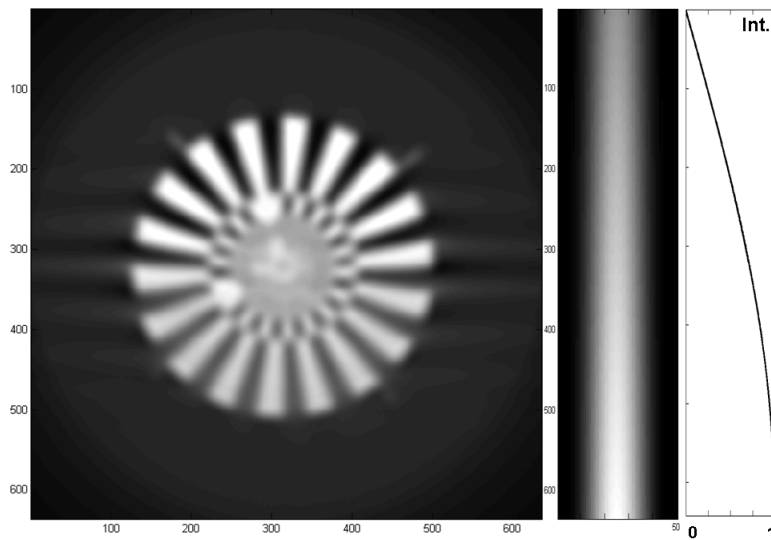
További számolásokat végeztem annak vizsgálatára, hogyan befolyásolja a rekonstruált kép minőségét, ha a reflexiós TOM elrendezés esetleges kiviteli pontatlanságából eredően a mintán létrehozott intenzitáseloszlás nem tökéletes. A számolásokat (a fenti esettel megegyezően) általam fejlesztett MATLAB kód segítségével végeztem. Különböző hibával terhelt intenzitás csíkokat generáltam, majd a reflexiós TOM-mal megegyező módon kiszámoltam a Richardson csillag modelljének szinogramját. A kapott szinogramból FBP segítségével rekonstruáltam a képet. A szimulációk során a kivilágító eloszlás keresztirányú félértékszélességét $2,34\mu\text{m}$, míg a szöglépés finomságát $0,3^\circ$ -nak választottam.



31. ábra: Rekonstrukció eredménye szinuszosan inhomogén kivilágítás esetén.

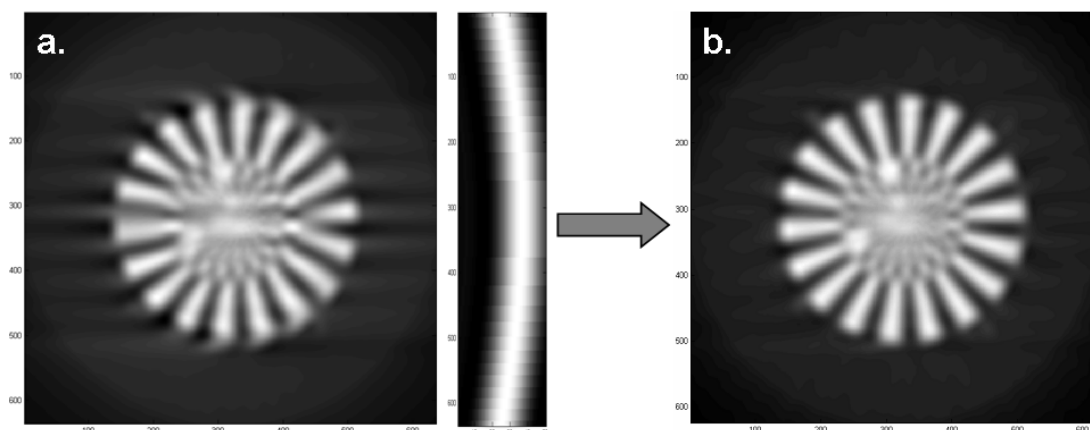
Először azt vizsgáltam milyen hatása van a keletkező képre, ha a kivilágító csík intenzitáseloszlása a hosszirány mentén inhomogén. A 31. ábrán látható esetben a csík

intenzitása a szélek felé haladva egyre kisebb. A hosszirány mentén az intenzitáseloszlás egy szinusz hullám fél periódusával közelíthető, ahogyan az ábra jobbszélső metszetén látható. Ezzel a kivilágítással rekonstruált kép intenzitása nem homogén, a kép közepe jobban megvilágított, ami a széleknél kontrasztvesztést eredményezhet. A kész képen ez a hatás azonban csak gyengén jelentkezik.



32. ábra: Rekonstrukció eredménye ferdén inhomogén kivilágítás esetén.

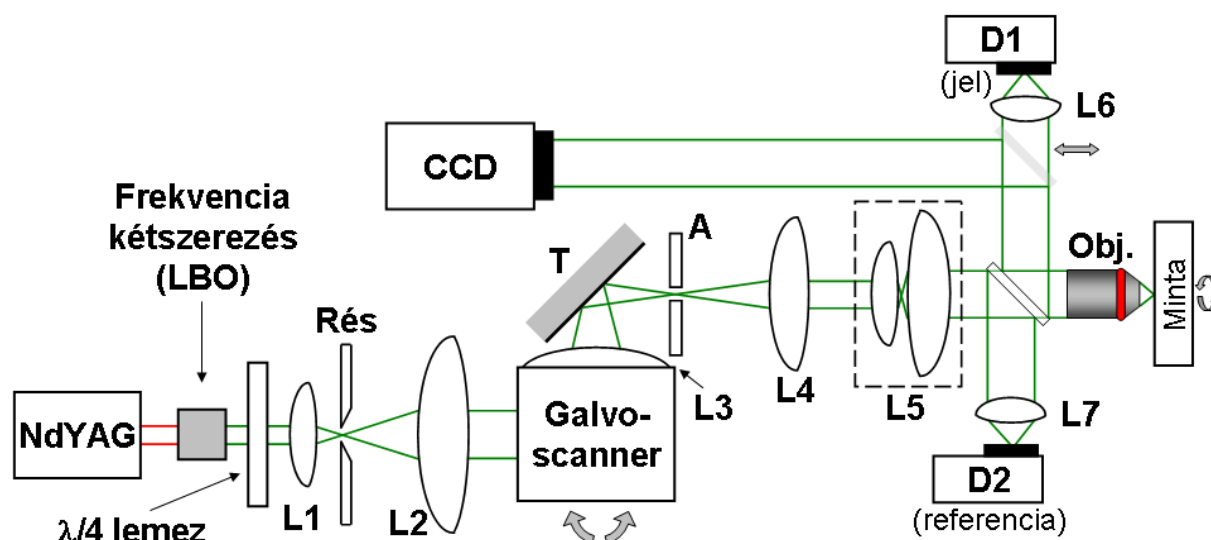
Hasonló eredményre vezet, ha a pásztázó csík szélének intenzitása nagyobb, ahogy azt a 32. ábra mutatja. Ebben az esetben azonban a kép alsó felén figyelhető meg enyhe kontrasztvesztés, ami a $0-180^\circ$ közti projekció felvétel következménye. Teljes, azaz 360° -os körüljárás esetén az effektus eltűnik. Az elrendezésben használt optikai elem rossz minőségéből, vagy hibás beállításából eredhet olyan kivilágítás, ami homogén ugyan, de hosszirányban nem egyenes. Ilyen hajlott, vagy hordós kivilágítás hatása figyelhető meg a 33. ábra (a.) képen. Ebben az esetben az elhajlás maximális mértéke a diffrakció limitált csík félértékszélességének fele, ami jól látható torzulást eredményez a rekonstruált képen. A hiba jelentős korrigálására van lehetőség a projekciók utólagos helyreigazításával. A fenti példák alapján, a Richardson csillag rekonstruált képen lévő esetleges torzulások segíthetnek megtalálni az optikai elrendezés hibáit, ami gyorsabbá teszi annak beállítását.



33. ábra: Rekonstrukció eredménye hajlott kivilágítás esetén (a.), valamint szoftveres korrekció után (b.).

Reflexiós TOM vizsgálata kis NA esetén, tárgyforgatással

Ahhoz, hogy a transzmissziós és reflexiós TOM technikák összehasonlíthatóak legyenek, a megépített reflexiós eszköznél kezdetben ugyanazt az objektívet használtam a minta kivilágítására és detektálására egyaránt, mint a 4.1.2 TOM transzmissziós üzemmódban fejezetben ismertetett elrendezés esetén. A projekciók felvételének irányát tárgyforgatással oldottam meg. A megvalósított reflexiós TOM szerkezetét 34. ábra mutatja be.



34. ábra: Reflexiós TOM kísérleti elrendezése, tárgyforgatással.

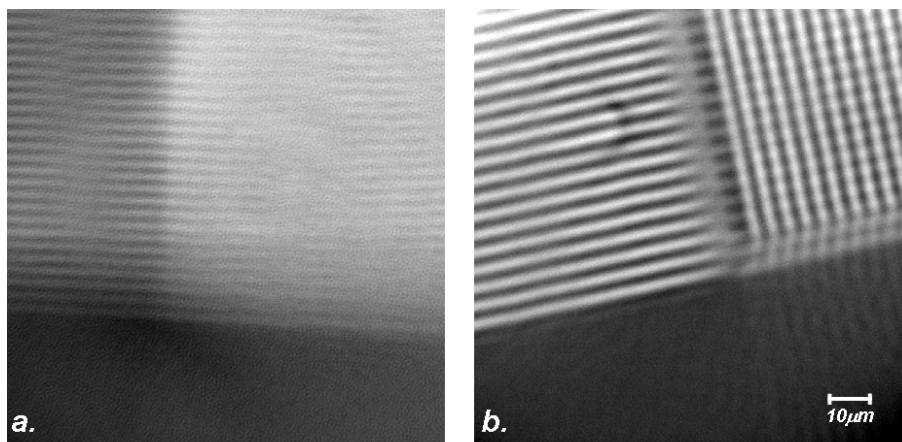
Fényforrásként egy impulzus üzemű, frekvencia kétszerezett Nd:YAG lézert használtam ($\lambda=532\text{nm}$; $\nu=16\text{kHz}$; $P=100\text{mW}$) melynek kilépő nyalábját egy $\lambda/4$ lemezzel cirkulárisan polárossá tettem, ezzel csökkentve a rendszer tükröző elemein fellépő esetleges veszteséget. A csík létrehozásához a lézer fényét egy hengerlencse (L1) segítségével egy állítható

szélességű résre képeztem. A résen történő diffrakció után, az L2 lencsével kollimált nyaláb a két dönthető tükröt tartalmazó un. Galvo-sanner (GSI Inc.) berendezésbe jutott. A szerkezet két szervomotorja segítségével a mintán létrehozott, diffrakció limitált csík pásztázása megoldható, mind a csík hosszára merőlege, mind párhuzamos irányban. Az eszköz tükrei $+20^\circ$ és -20° közötti szögtartományban 65536 lépést képesek megtenni, így a megvalósítható minimális szöglépés: $\Theta_{\min}=0,00061^\circ$ ($10\mu\text{rad}$). Az eltérített nyalábot a Galvo-scanner fő lencséje (L3) egy síkban lefokuszálta ahol egy változtatható apertúrával lehetőség volt a mintát pásztázó csík hosszának beállítására (A). A nyalábot ezután egy újabb, az előzővel azonos paraméterű fő lencse (L4) újra kollimálta, ami a diffrakció limitált csíkot előállító objektív (Obj: $M=4$; $NA=0,1$) belépő apertúrájára jutott. Az apertúra a rendszer azon síkjában helyezkedett el, ahol a pásztázás során a kollimált nyaláb pozíciója nem, csak beesési szöge változott. A mintán a kivilágító nyaláb optikai tengelytől való eltérésének szöge a fókuszpozíció elmozdulásának felelt meg. Az objektív és L4 közé bekerült a rendszerbe egy szögnagyítást végző lencsepár (L5) így a mintán elérhető legkisebb pásztázó lépés $\Delta r=0,149\mu\text{m}$ -nek adódott. A tárgyasztalt léptetőmotorra szereltem, így biztosítottam a pásztázási irány változását. A motor egy lépéséhez $\Delta\varphi=0,15^\circ$ tartozott.

A mintáról visszaverődő fényjelet az objektív előtt elhelyezett nyalábosztó hártya segítségével juttattam a D1 fotodióda felületére. Mivel a pásztázás során a visszavert fény szöge is változik, így kritikus, hogy minden lépésnél a teljes fényintenzitás a detektor felszínére jusson. Ehhez kellően nagy felületű, Si fotodiódát ($3,6\text{mm}^2$) és egy lencsét (L6) használtam. A mérések során a fényforrás pillanatnyi teljesítménye a termális fluktuáció következtében folyamatosan változott, így az objektívre eső fény egy részét a D2 fotodiódára képeztem, a jelet detektáló karhoz hasonló módon. A mintáról visszavert jelet és a referencia teljesítményt egy digitális adatgyűjtő rendszerrel szimultán mintavételeztem és a hányadosukat vettem az adott projekció egy nyalábhelyezethez tartozó intenzitás értékének. A motorok vezérlését, a jel digitalizálását és a szinogram felvételét egy saját fejlesztésű PC szoftver végezte. A mintáról visszavert fényt, a jelet detektáló karból egy betolható tükörrel egy CCD kamerára lehetett képezni. Az objektív-kamera rendszert ekkor koherens fénnel kivilágított mikroszkópként lehetett használni, ami segített a minta pozicionálásában és az optikai elemek helyes beállításában.

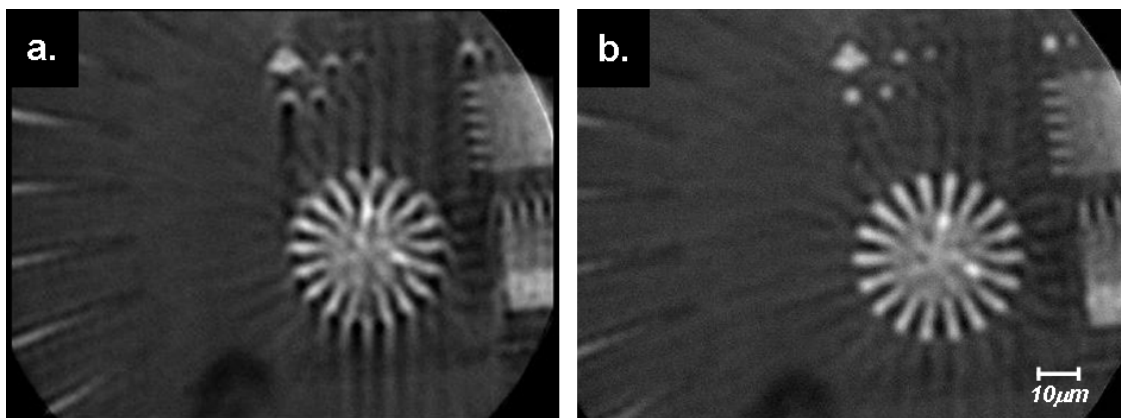
Az ismertetett, reflexiós TOM elrendezés által létrehozott kép minőségét először a transzmissziós berendezésnél használt, rácsot tartalmazó mintán vizsgáltam. Az itt alkalmazott kivilágító hullámhossz miatt, a mintán fellelhető legsűrűbb rács periódusa is

nagyobbnak bizonyult a rendszer számolt feloldási küszöbénél, így annak képén tökéletesen kivehető mintázatot vártam. A felvételeket a minta olyan területéről készítettem, ahol a rácsvonalak egy részének hossza vízszintesen, míg más részük erre merőleges irányban fekszik. Ilyenkor a helyes rekonstrukcióhoz a szinogram nagyobb tartománya szükséges, mint egy irányú rácsvonalak esetén. Reflexiós elrendezéssel, $4\mu\text{m}$ periódusú rácstról készült felvétel látható a 35. ábrán.



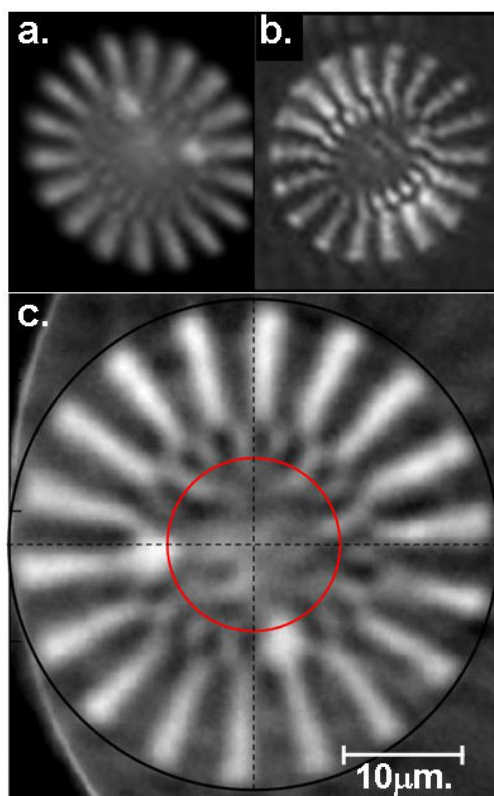
35. ábra: Forgástengely korrekció nélküli (a.) és tengely korrekcióval készült (b.) felvétel $4\mu\text{m}$ periódusú rácstról.

Az (a.) kép közvetlenül a felvett projekciókból rekonstruált rácsot ábrázolja. A várakozással ellentétben a függőleges rácsvonalak egyáltalán nem vehetőek ki a képen, helyüket egy telítettebb tartomány jelzi. A vízszintes vonalak mentén is periodikus kontrasztcsökkenés figyelhető meg. A hibát a tárgyforgató mechanika forgástengelyének kóválygása okozza, melynek következtében az egyes projekciók a felvétel során elcsúsznak egymáshoz képest, így a rekonstrukció alatt egy adott képpont nem a megfelelő projekció értékek összege. Ez a hiba korrigálható melynek módját a később részletesen ismertetem. A korrigált képen (b.) már kivehetőek mind a vízszintes, mind a rájuk merőleges irányban futó rácsvonalak, a kép azonban még mindig hordoz hibát, aminek eltüntetése hatékonyabb korrekciót igényel. A rács vizsgálatát követően felvételt készítettem a Richardson csillagról.



36. ábra: Rekonstruált képek a Richardson csillagról tengely korrekció nélkül (a.) és tengelykorrekcióval (b.).
($\lambda=532\text{nm}$; $\text{NA}=0,1$)

A csillag szimmetriája miatt a felvett szinogram minden projekciója elengedhetetlen információt hordoz a kép helyes rekonstrukciójához. Ilyen esetben a képen nagyobb súllyal jelenik meg a forgásból eredő hiba hatása. A 36. ábra (a.) képen látható torzult csillag és a körülötte lévő szellemvonalak ugyancsak a tengelyhibából származó artifaktumok. Korrekció után a csillag szeletei és a rendszer feloldásának határa jól kivehető, ahogy a 36. ábra (b.) képen látható. Ez a határ azonban közel esik a csillag legnagyobb gyűrűjének belső pereméhez, ahol a világos és sötét szeletek periódust váltanak, ezért a homogén peremvonal pontatlanná teszi a feloldás határának becslését. Ennek kiküszöbölésére újabb felvételt készítettem a csillagról valamivel nagyobb numerikus apertúrájú objektívvel. Ezt a képet összehasonlítottam egy Zeiss Axiovert 135M típusú, ponttal pásztázó konfokális mikroszkóp felvételeivel.



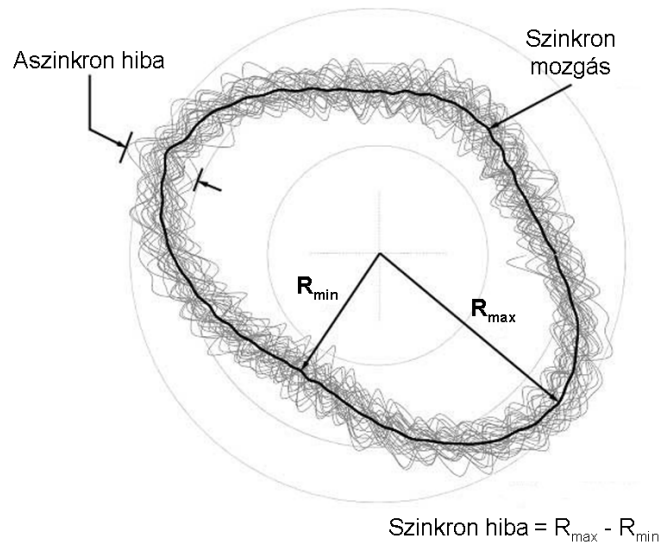
37. ábra: Felvételek a Richardson csillagról Zeiss Axiovert 135M konfokális mikroszkóppal (a., b.) és reflexiós TOM-mal(c.). Használt objektív: M=5; NA=0,15.

Mindkét eszközben ugyanazt a fedőlemez korrekcióval rendelkező, ötszörös nagyítású és 0,15 NA-jú Zeiss objektívet használtam a képek felvételéhez. A 37. ábra (a.) és (b.) képei a konfokális mikroszkóppal készültek, különböző túlyuk átmérő beállítása mellett a detektor oldalon. A (c.) kép a reflexiós TOM rekonstruált és korrigált felvétele. Látható, hogy a konfokális eszköz képeinek kontrasztja vagy gyengébb (a.), vagy nem homogén eloszlású (b.), de a Richardson csillag második gyűrűjének szeletei mindkét képen kivehetők. A szeletek jól elkülöníthetők a TOM által rekonstruált képen is. Itt piros körrel jelöltem azt a területet, melynek mentén még látható a visszaverő és elnyelő szeletek mind a 18 periódusa. A vizuális becslés alapján a TOM által feloldott legkisebb kritikus távolság $1,23\mu\text{m}$ -nek adódik. Ilyen jellegű becslést a konfokális eszköz felvételi alapján nem tudtam tenni, mivel azok kontrasztja erősen inhomogén eloszlású. A képek alapján azonban megállapítható, hogy a konfokális rendszer feloldása biztosan rosszabb, mint a TOM-é.

Korrektíós eljárás forgástengely hibájának kiküszöbölésére

A TOM képalkotásnál használt szűrt-visszavetítés abban az esetben ad helyesen rekonstruált képet, ha a felvett projekciók középpontjai egy egyenes mentén helyezkednek el a szinogramban. Ennek feltétele, hogy a forgástengely – ami körül a pásztázási irány változik –

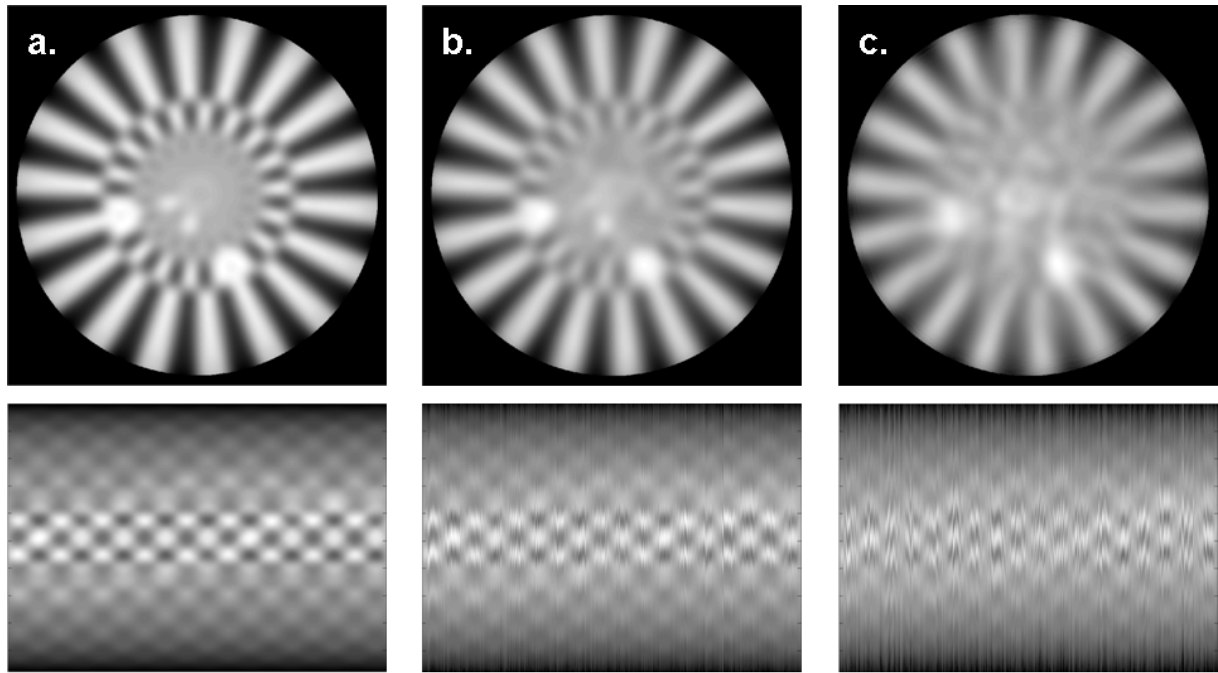
pozíciója a szinogram felvétele során állandó legyen és illeszkedjen az optikai tengelyre. Olyan forgató mechanika, ami az előbbi feltételnek maradéktalanul eleget tesz, a gyakorlatban nem létezik [48]. Egy forgó tengely pozíciójának laterális irányú vándorlása látható a 38. ábrán, általános esetben.



38. ábra: Forgástengely mozgáshibája [48].

A hibát okozó vándorlás szétválasztható ún. szinkron és aszinkron mozgásra, melyek közül a szinkron mozgás a tengely vándorlásának átlaga, több körbefordulás után. Ebből a mozgásból eredő tengelypozíció hiba korrigálható, mivel az elmozdulás pályája mérhető és utólag az elcsúszott projekciók helyrehozhatók. A véletlenszerűen változó elmozdulás, más szóval az aszinkron hiba hatása csak az elmozdulás valós idejű méréssel kompenzálható a szinogramon.

Szimulációkkal vizsgálható, hogy a forgástengely vándorlásának nagysága milyen mértékben torzítja a rekonstruált képet. Az erre irányuló vizsgálatot és számolásokat Dudás László doktoranduszhallgató végezte el. Az itt bemutatásra kerülő eredmények az általa fejlesztett számolási rutinok felhasználásával születtek. A rutinokkal kiszámolható a Richardson csillag szinogramja, egy $1,77\mu\text{m}$ félértékszélességű, diffrakció limitált pásztázó intenzitáseloszlást feltételezve. Ez az eloszlás megegyezik a korábban bemutatott Zeiss konfokális berendezés, 0,15 NA-jú objektívje által előállított intenzitáseloszlással, $\lambda=532\text{nm}$ kivilágító hullámhossz esetén. A szöglépést kellően finomra kell választani ($\Delta\phi=0.1^\circ$), hogy a rekonstruált képek kontrasztja kellően nagy legyen. Az aszinkron hiba hatásának vizsgálatához az egyes projekciókat elcsúsztattuk egymáshoz képest, $\sigma=1,77\mu\text{m}$ és $\sigma=3,54\mu\text{m}$ standard deviációjú véletlenszerű elmozdulással terhelve a szinogramot.

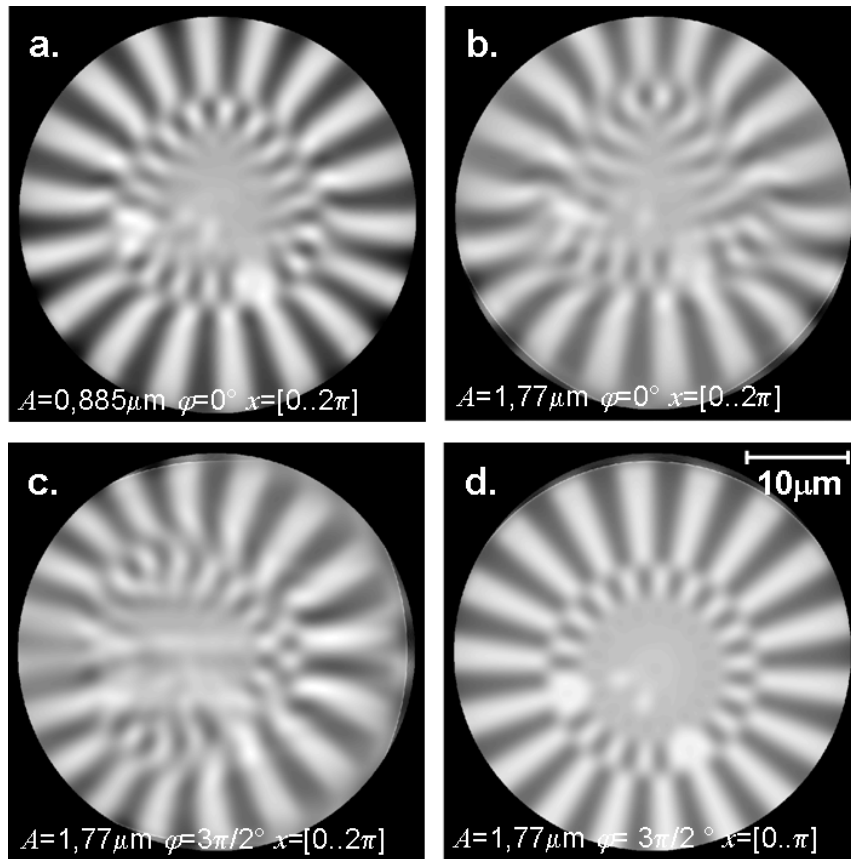


39. ábra: Aszinkron hibával terhelt szinogramok és a hozzájuk tartozó rekonstruált kép, $\sigma = 0\mu\text{m}$ (a.), $\sigma = 1,77\mu\text{m}$ (b.) és $\sigma = 3,54\mu\text{m}$ (c.) esetben.

A tengelyhiba nélküli és aszinkron hibával terhelt, rekonstruált képek a 39. ábrán láthatók. A (b.) szinogramon a projekciók véletlenszerű elmozdulásának maximum amplitúdója, kétszerese a pásztázó intenzitás keresztirányú félértékszélességének. Az aszinkron hiba a szinogramon jól látható, de a hozzá tartozó rekonstruált képnek csak a belső, nagyfrekvenciás része válik elmosódottá. Ezen túl enyhén csökken a Richardson csillag második gyűrűjének kontrasztja. Nagyobb aszinkron hiba hatására a rekonstruált kép egyre alacsonyabb frekvenciájú tartománya hordoz téves információt, ahogy az a (c.) képen látható. A projekciók elmozdulásának maximum amplitúdója itt négyszerese a pásztázó intenzitás félértékszélességének. A hiba következtében a csillag második gyűrűjének szeletei is teljesen összemosódnak, ami a rendszer feloldásának jelentős csökkenését jelzi. Ebben az esetben, a hiba hatására már a szinogram is teljesen felismerhetetlen. A képek alapján megállapítható, hogy forgató mechanika tengelyének a kivilágító csík szélességével összemérhető laterális és véletlenszerű mozgása már jelentősen csökkenti a rendszer effektív feloldóképességét.

Külön vizsgálható a tengely szinkron hibájának hatását. A számolt projekciók elmozdulásait a középvonalhoz képest egy $\varepsilon(x) = A \cdot \sin(x + \varphi)$ harmonikus hibafüggvénnyel adtuk meg és vizsgáltuk a rekonstruált kép minőségét különböző A amplitúdó, φ fázis értékeknél, valamint az $x = [0..2\pi]$ és $x = [0..\pi]$ tartományokon. Az optikai rendszer beállításánál szerzett tapasztalatok szerint a tengely egy körrel közelíthető pálya mentén

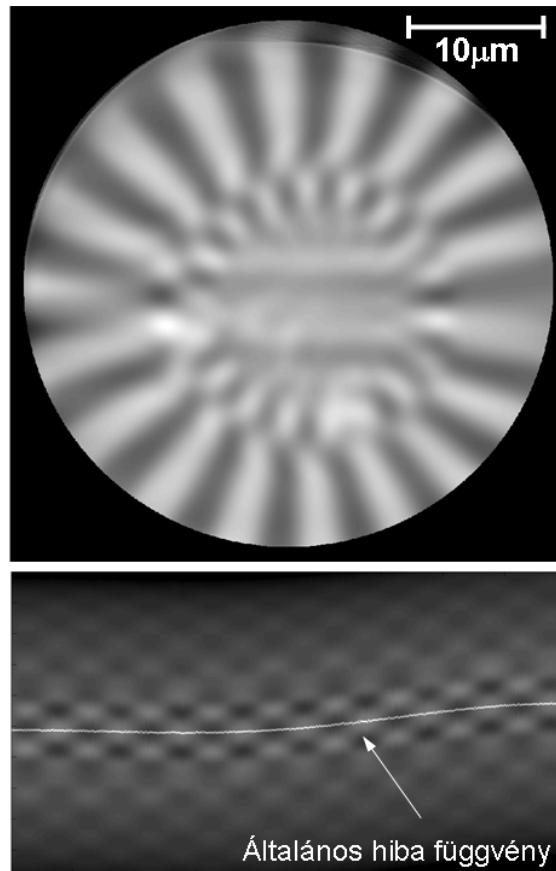
kóvályog, ami a szinogramra vetítve harmonikus hibafüggvénynek felel meg. A rekonstruált képek a 40. ábrán láthatók.



40. ábra: Szinkron hibával terhelt, rekonstruált képek, különböző hibafüggvény paraméterek mellett.

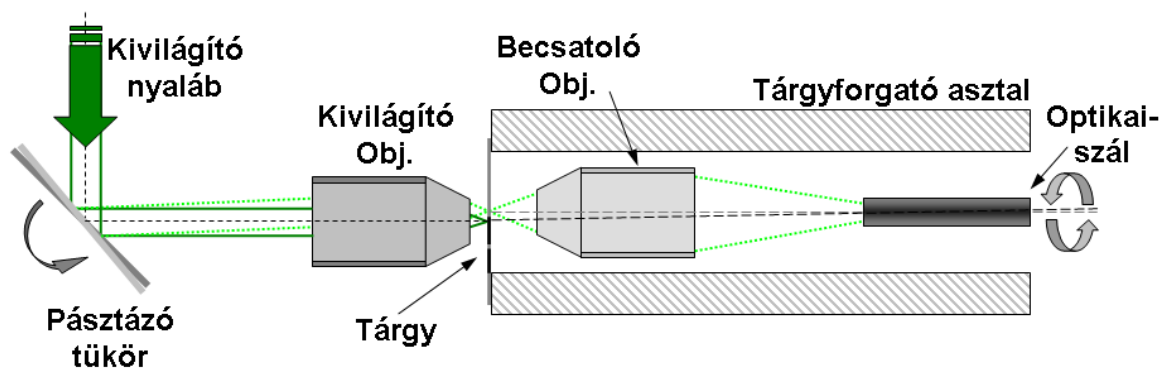
Az (a.) és (b.) képeken a hibafüggvény amplitúdója rendre $0,885\mu\text{m}$ és $1,77\mu\text{m}$ ami megegyezik a pásztázó intenzitás keresztirányú félértékszélességének felével és magával a félértékszélességgel. Az aszinkron hiba hatásával ellentétben itt mindkét esetben látható a Richardson csillag második gyűrűjének néhány szelete. A csillag karjai azonban görbék és helyenként összeolvadnak. A csillag külső gyűrűjének szimmetriája is sérül. A hibafüggvény fázisának módosítása megőrzi a képen kialakult struktúra jellegét és elforgatja a jellemző torzulások irányát (c.). Ez a tulajdonság segíthet a rendszer hibájának gyorsabb felismerésében, és egy esetleges korrekciós függvény pontosabb megadásában. A torzulások mértéke jelentősen csökken, ha a harmonikus hibafüggvény egy teljes periódusa helyett csak annak felével terheljük a szinogramot. Ez látható a (d.) képen, ahol vizuális kiértékeléssel nem észlelhető a hiba, azonban a rendszer feloldásának kvantitatív megállapítása továbbra is pontatlan lehet. A gyakorlatban kialakulhatnak bonyolultabb (több harmonikus függvény összegével közelíthető) szinkron hibagörbék, melyek azonosításában és korrekciójában segít

az alkalmazott modell. Általános esetben a szinkron és aszinkron kóválygás egyidejűleg van jelen egy rögzített szinogramon.



41. ábra: Forgástengely általános hibájával terhelt szinogram (alul) és rekonstruált kép (felül).

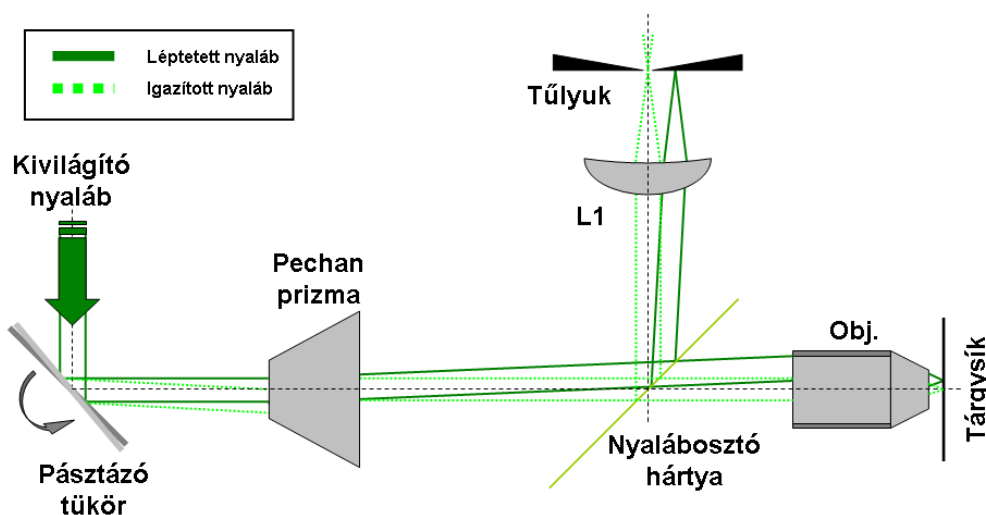
A 41. ábra ezt az esetet mutatja be. A projekciók elcsúszását leíró görbe két harmonikus függvény összege. A maximális amplitúdó $1,77\mu\text{m}$, amire ráakódik egy normál eloszlású, közel 200nm-es standard deviációjú zaj. A rekonstruált képen jelentős torzulások figyelhetők meg, melynek kialakulásáért első sorban a hibafüggvény szinkron mozgást leíró része felel.



42. ábra: Tengelyhiba mérésére alkalmas elrendezés tárgyforgatás esetén.

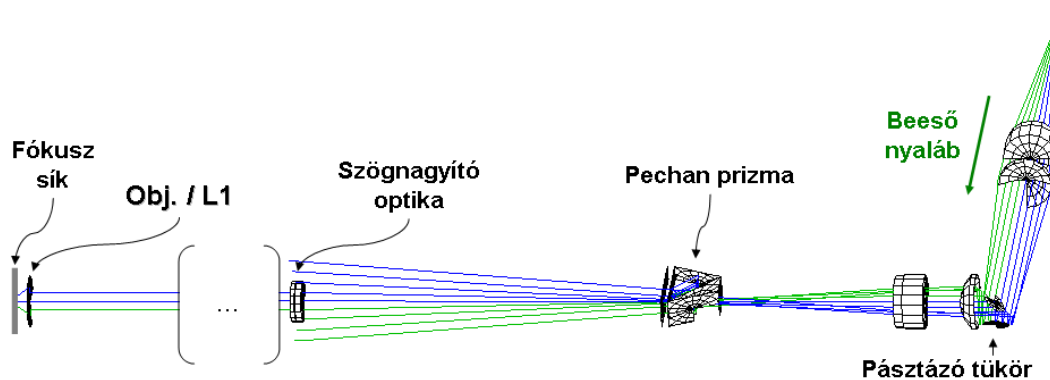
A fent bemutatott eredmények alapján a forgató mechanika hibájának hatása, csak a hiba valósidejű mérésével és azonnali, vagy utólagos korrekciójával csökkenthető elfogadható szintűre. A tárgyforgatást használó, reflexiós TOM elrendezésben a hiba mérését egy optikai-szálba csatoló rendszer segítségével oldottam meg. A mintát tartalmazó tárgylemez mögé egy második mikroszkóp objektívet tettem, mely első fókuszpontjának síkja egybeesik a tárgy síkjával (42. ábra). A fókuszot a minta mellé, a pásztázási tartományon belülré pozicionáltam. Az objektív hátsó fókuszába egy egymódusú optikai szálát raktam. A projekciók felvétele során a diffrakció limitált pásztázó csík fényének egy része a minta mögötti objektíven keresztül az optikai szálba csatolódt. A maximális fényteljesítmény akkor jutott a szálba, amikor a kivilágító csík éppen a minta mellé pozicionált fókuszpontba esett. A tárgyasztalt a becsatoló rendszerrel együtt mozgatva és szöglépésenként mérve a maximális, becsatolt teljesítményhez tartozó pásztázó tükör pozícióját, a tengely körbefutásának hibája mérhető. Az így mért pozíciókkal megadható egy virtuális forgásközpont a tárgy síkjában, melyhez minden mért projekció utólag hozzáigazítható. Ezzel a módszerrel történt a korábban bemutatott, TOM-mal készült felvételek korrekciója [35.(b.), 36.(b.), 37.(c.)].

A pásztázási irány megváltoztatására nagy kiterjedésű vagy mozgásra érzékeny minta esetén nem optimális megoldás a tárgyforgatás. Ilyen esetekben a diffrakció limitált csík és a pásztázási irány együttes elforgatása szükséges, ami képforgató prizmaival – Dove, vagy Pechan prizma [49] – megoldható. A prizmat forgató mechanika tengelyhibája és a rendszer valamint, a prizma optikai tengelyének nem tökéletes fedése ilyenkor is szinkron és aszinkron hibát vezet be a szinogramon. Ennek korrekciója továbbra is valós idejű hibafüggvény meghatározást igényel. A képforgató prizmat használva a rendszer egy adott pásztázási szöghöz tartozó tengelyhibája ekvivalens a pásztázó nyaláb eltolásával, ahogy azt a 43. ábra mutatja. Ilyenkor a képforgató elem (Pechan prizma) optikai tengelyének szöge és pozíciója nem illeszkedik tökéletesen a rendszer optikai tengelyére. Az így keletkező eltolás azonban korrigálható, ha mérni tudjuk annak mértékét.



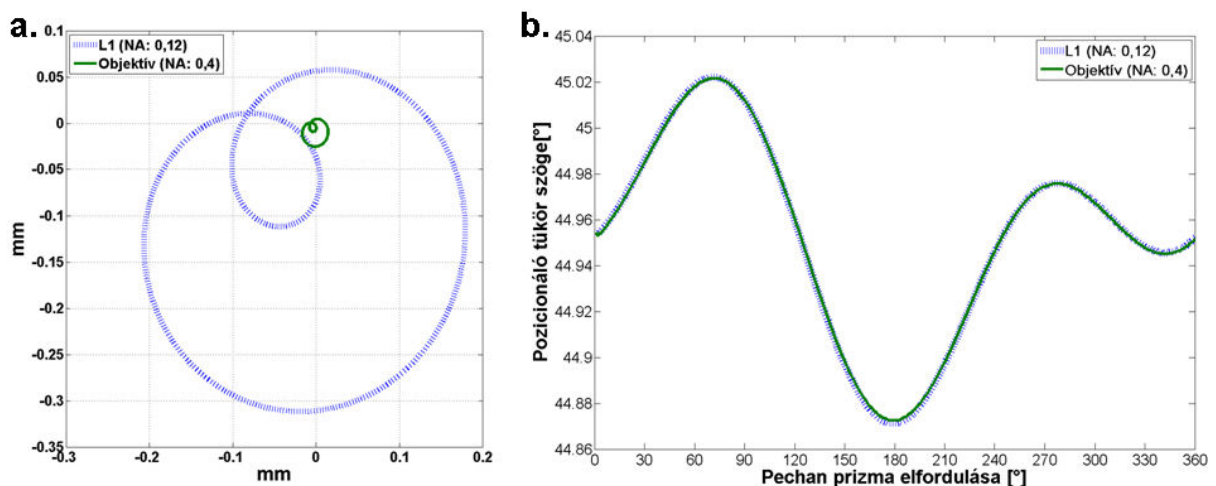
43. ábra: Tengelyhiba mérésére és korrekciójára alkalmas elrendezés nyalábforgatás esetén.

A reflexiós TOM elrendezésben szükséges nyalábosztó hártával a bejövő fény egy része 90 fokban kicsatolható. A kicsatolt karban a fény egy lencsével összegyűjthető és egy tűlyukon átfókuszálva annak intenzitás mérhető. Tengelyhiba-mentes esetben az így mért intenzitás maximális lesz. Amint a tengelyhiba következtében a forgató elem eltolja a nyalábot, a tűlyuk után nem mérhető intenzitás. A pásztázó tükröt addig pozicionáljuk, míg a tűlyukon újra maximális fény jut át. Ekkor a rendszer virtuális forgástengelye kijelölhető és az így mért pozíció körül a projekció rögzíthető. Annak igazolására, hogy a leírt módszer megvalósítható, Dudás Lászlóval megvizsgáltuk a pásztázó és nyalábforgató rendszer modelljét OSLO [57] sugárkövető szoftver segítségével. Az OSLO egy tetszőleges optikai rendszer modelljének megalkotására és a rendszerparaméterek optimalizálásához szükséges sugároptikai számítások elvégzésére alkalmas kereskedelmi szoftver. A szoftver korlátozott mértékben figyelembe veszi a leképező rendszer hullámoptikai tulajdonságait is. Alkalmas PSF számolására, vagy a polarizáció figyelembe vételére a nyalábterjedés során.



44. ábra: Nyalábpásztázó és forgató elrendezés OSLO modellje.

A modell szerkezete a 44. ábrán látható. A nyalábforgató elem – a későbbi méréseknél is használt Pechan prizma – optikai tengelye enyhe ($0,4^\circ$) szöget zár be a rendszer optikai tengelyével és a köztük lévő különbség laterális irányban $6\text{--}7\mu\text{m}$. Ilyen beállítások mellett, a pásztázás irányának változtatása során a prizma eltolja a kivilágító objektív vagy az eltolást mérő karban használt lencse (L1) fókuszpozícióját. A megváltozott fókuszpozíció, azaz a forgástengely aktuális helyzete és a korrekcióhoz szükséges tükröpozíció OSLO kód segítségével számolható. A számolás során egy összetett lencserendszerből álló mikroszkóp objektív modelljét ($\text{NA}=0,4$) használtuk kivilágító objektívnek, míg a tülyukon átfókuszáló elemet egyszerű plánkonvex lencsével közelítettük ($\text{NA}=0,12$). A számolt fókuszok helyzete látható a 45.(a.) ábrán.

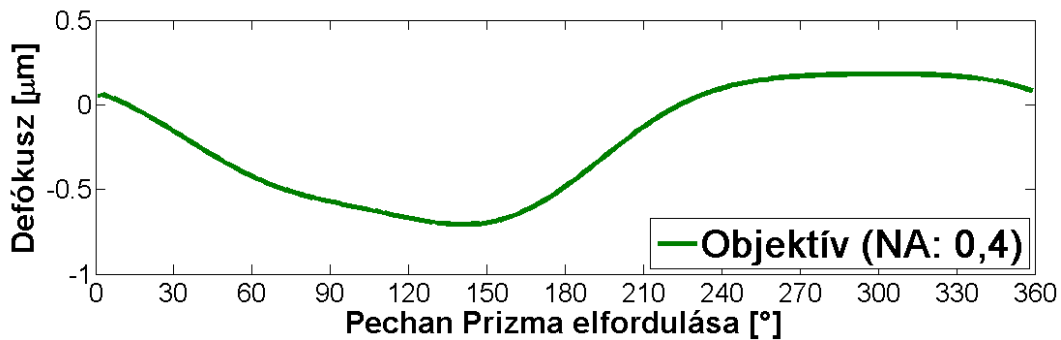


45. ábra: Forgástengely számolt hibagörbéje (a.) és a korrekcióhoz szükséges tükröpozíciók (b.).

A szaggatott, kék görbe az eltolást mérő karban használt lencséhez (L1), míg a zöld, folytonos görbe a kivilágító objektívhez tartozó fókuszvándorlás. A görbék mérete eltérő, a különböző nagyításnak megfelelően, de jellegük és irányuk megegyező. A (b.) grafikonon látható görbék a szükséges korrekcióhoz tartozó tükröpozíciók a prizma körbefordulása során. A két görbe tökéletesen fedí egymást, ami igazolja, hogy a forgástengely hibájából származó eltolás korrigálható az általam ismertetett módon, továbbá a hiba nagyságát mérő karban nem szükséges nagy numerikus apertúrájú, vagy összetett optika használata.

A fenti módszer segítségével a projekciók helyesen pozícionálhatók a szinogramban, így a tengely szinkron és aszinkron hibájának hatása eltüntethető a rekonstruált képről. A korrekcióhoz szükséges tükröpozíciónál, a Pechan prizmán áthaladó nyaláb hosszabb utat tesz meg, mint ideális esetben így a nyalábforgatás során változhat a kivilágító objektív fókusz távolsága. Ez a változás is számolható OSLO modell segítségével, az eredményt

NA=0,4 esetben a 46. ábra mutatja. A maximális különbség az ideális helyzethez tartozó fókusz távolságtól kevesebb, mint $1\mu\text{m}$, ami nem okoz további hibát a rekonstruált képen, mivel a rendszer mélységélessége ebben az esetben $6.65\mu\text{m}$ ($\lambda=532\text{nm}$).



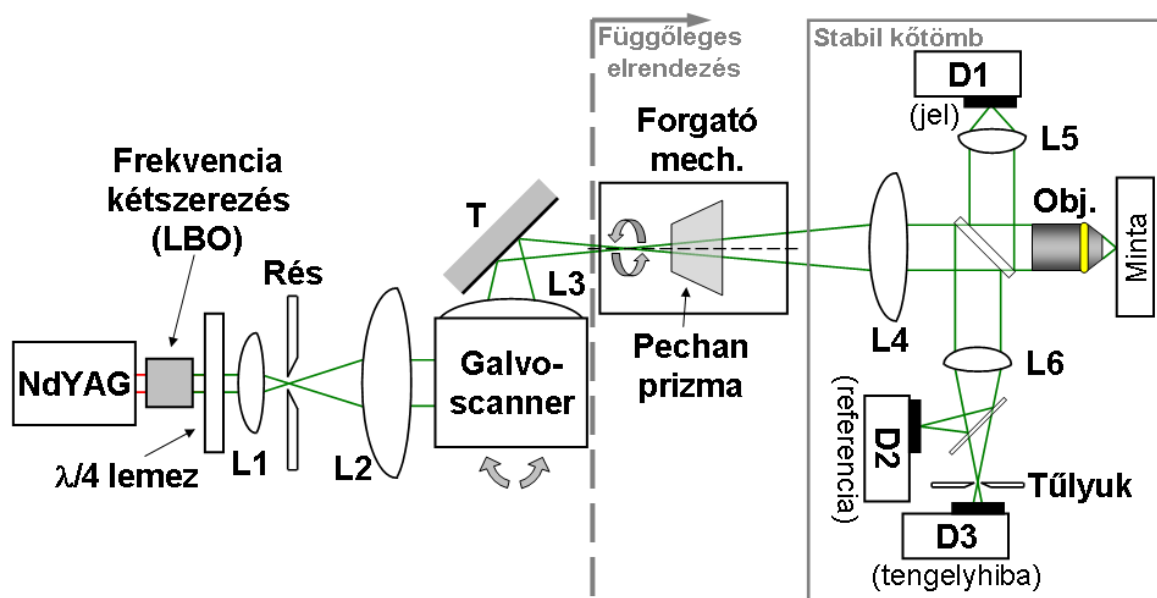
46. ábra: Kivilágító objektív fókusz távolságának változása a tengelyhiba korrekciójának következtében.

Az általam ismert két eljárás mind tárgyforgatás, mind nyalábforgatás esetén alkalmas arra, hogy a forgató mechanika tengelyhibájából származó képminőség romlást tetszőlegesen kismértékűre csökkentse.

Reflexiós TOM vizsgálata 0,4 NA esetén, nyalábforgatással

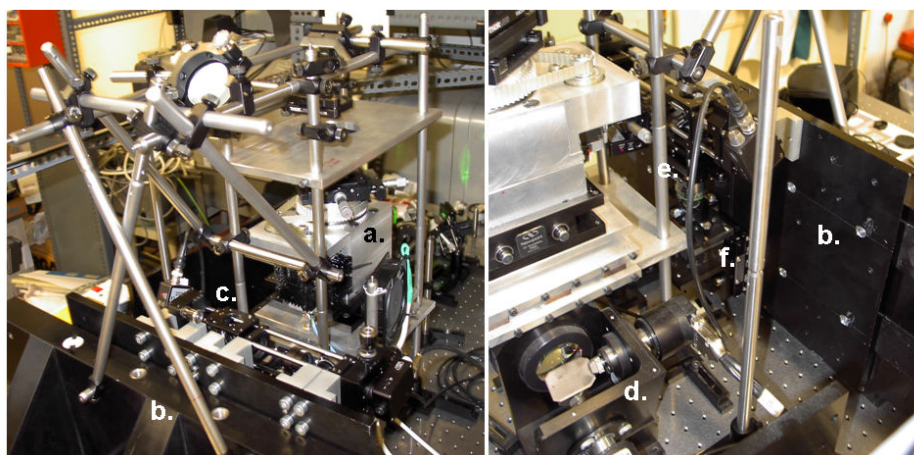
A tengelyhibára vonatkozó számolások eredményeit felhasználva átépítettem a reflexiós TOM optikai elrendezését úgy, hogy a tárgyforgatást nyalábforgatásra cseréltem. A továbbfejlesztett elrendezés vázlatos rajza a 47. ábrán látható. Forgatóelemnek Pechan prizmát választottam, amit egy speciálisan tervezett, léptetőmotorral hajtott forgató mechanikába illesztettem. A mechanika úgy lett tervezve, hogy annak forgástengelye a lehető legkisebb kóválygással bírjon, valamint szöge és helyzete pontosan a rendszer optikai tengelyére illeszthető legyen. A prizma befogásának szöge és helyzete szintén állítható volt a mechanika forgástengelyéhez képest. Azért, hogy a rendszer érzéketlen legyen a mechanika és a prizma súlyeloszlásából származó apró elmozdulásokra, a forgástengelyt függőlegesre állítottam. Aprólékos beállítással a rendszer forgástengelyének szinkron és aszinkron hibája együttesen $2\text{--}5\mu\text{m}$ közé esett. Ennél az értéknél továbbra is szükséges a valós idejű tengelyhiba meghatározás és korrekció, így a korábbi, referencia intenzitást mérő kart kiegészítettem egy harmadik fotodetektorral (D3) és egy tülyukkal. Mivel a Pechan prizma ϕ szögelfordulás esetén 2ϕ -t forgat az áthaladó nyalábon, a léptetőmotor áttételét növelni kellett, de a legkisebb szöglépés a minta síkjában továbbra is $0,15^\circ$ maradt. A kivilágításra használt objektívet egy nagyobb feloldóképességű Zeiss LD "Plan-Neofluar" (M=20, NA=0,4) típusra váltottam melynek

fedőlemez korrekciója állítható. A három detektor jelének mintavételéhez és feldolgozásához egy saját fejlesztésű, kétcsatornás, digitális Lock-in erősítőt használtam, melynek egyik csatornájára jutó forrás digitálisan kapcsolható D1 és D3 detektorok között. A frekvencia-szelektív detektálásnak köszönhetően a környezetből származó fény hatása nagymértékben szűrhetővé vált, így a rendszer jel/zaj aránya 10^3 - 10^4 körül adódott.



47. ábra: Reflexiós TOM kísérleti elrendezése, nyálábfordatással.

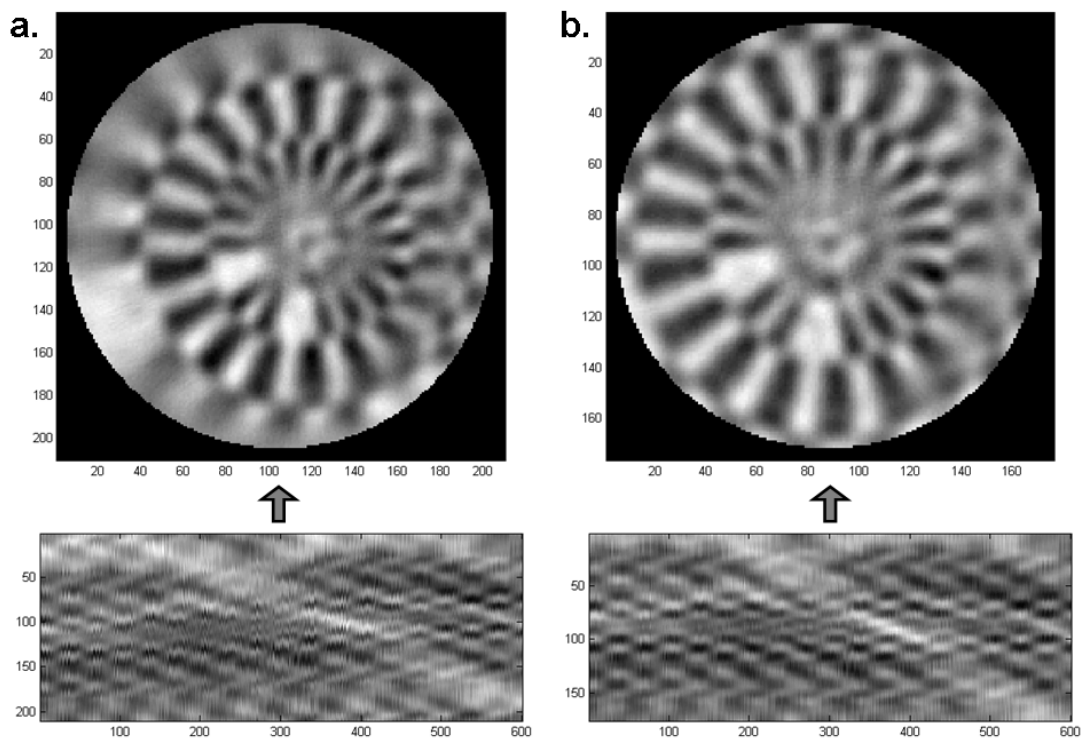
A zaj csökkentésére használt nagyszámú mintavétel, valamint a folyamatos tengelyhiba mérés következtében egy 1200 projekcióból álló kép felvételéhez körülbelül 70 órára volt szükség. A hosszú mérési idő miatt a környezet hőingása folyamatosan változtatta az optikai elemek helyzetét, ami megnövelte a tengelyhiba mérésének pontatlanságát.



48. ábra: Reflexiós TOM nyálábfordatással. Forgató mechanika (a.) Márványtömb (b.) Nyálábosztó hártva (c.) Pozicionáló tükör (d.) Objektív (e.) Tárgyasztal (f.)

Ennek kiküszöbölésére a kivilágító optikát, a tárgyat, valamint a jel és referencia karok elemeit egy robosztus műmárvány tömbhöz rögzítettem. A stabil elrendezésről készült képek láthatók a 48. ábrán.

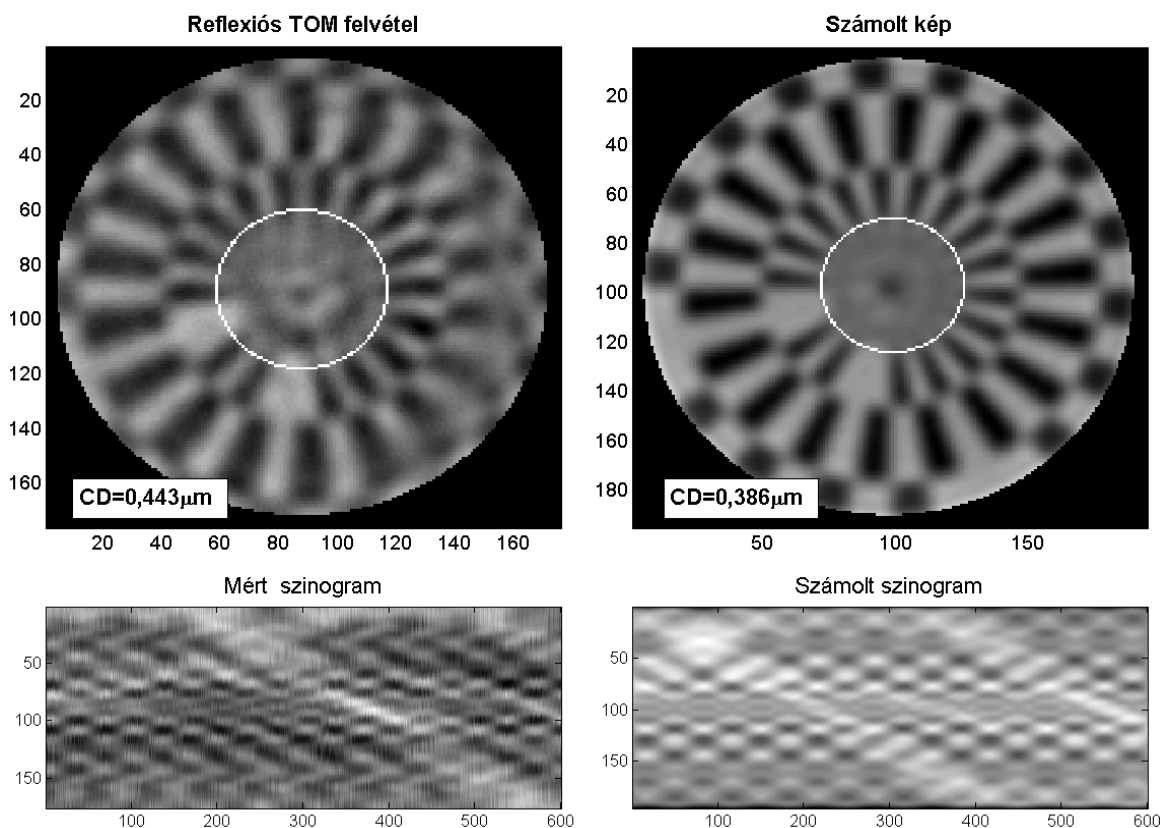
A rendszer feloldóképességének vizsgálatára felvételeket készítettem a Richardson csillag középtartományáról. A mért szinogramok a valós idejű tengelyhiba korrekció ellenére továbbra is zajosnak bizonyultak ezért további korrekcióra volt szükség. Egy algoritmus segítségével megtalálhatók a csillag egyes projekcióiban a gyors intenzitásváltásokhoz tartozó nyaláb pozíció és ezek egymáshoz igazíthatók. Az így alkalmazott finomhangolás eredményét mutatja a 49. ábra.



49. ábra: Csillag rekonstruált képe valós idejű tengelyhiba korrekcióval (a.) és utólagos finomhangolással kiegészítve (b.).

Az (a.) képhez tartozó szinogramon aszinkron hiba jellegű zaj látható, ami az optikai elemek kismértékű helyzetváltozásának tulajdonítható, a hosszú mérés során. Az így rekonstruált képen a csillag karjai enyhén torzulnak. Ez a torzulás a projekciók utólagos igazításával jelentősen csökkenthető, amint az a (b.) képen látható. A csillag modelljét és az alkalmazott optika paramétereit felhasználva kiszámoltam a rendszer által, ideális esetben felvett szinogramot és az abból rekonstruált képet. Ezt összehasonlítottam a mért, korrigált és rekonstruált képpel valamint szinogrammal. A mérés és a számolás során a kivilágító

intenzitáseloszlás pásztázó lépése a minta felszínén $\Delta r = 0,041\mu\text{m}$ volt, míg a pásztázási irány lépésenkénti szögelfordulása $\Delta\phi = 0,3^\circ$. A szinogramok és a hozzájuk tartozó rekonstruált képek az 50. ábrán láthatók. A számolt és mért szinogram jellegre megegyezik, a mért projekciók zaja azonban kevésbé kontrasztos képet eredményez. A rekonstruált képeken fehér kör jelzi azt a területet, melynél kisebb görbe mentén a csillag szeleteinek modulációja már nem tartalmazza az összes periódust, vagy teljesen megszűnik. Az így meghatározott körökhöz tartozó szeletek vastagága adja az optikai rendszer által feloldható legkisebb méretet (kritikus méret: CD).

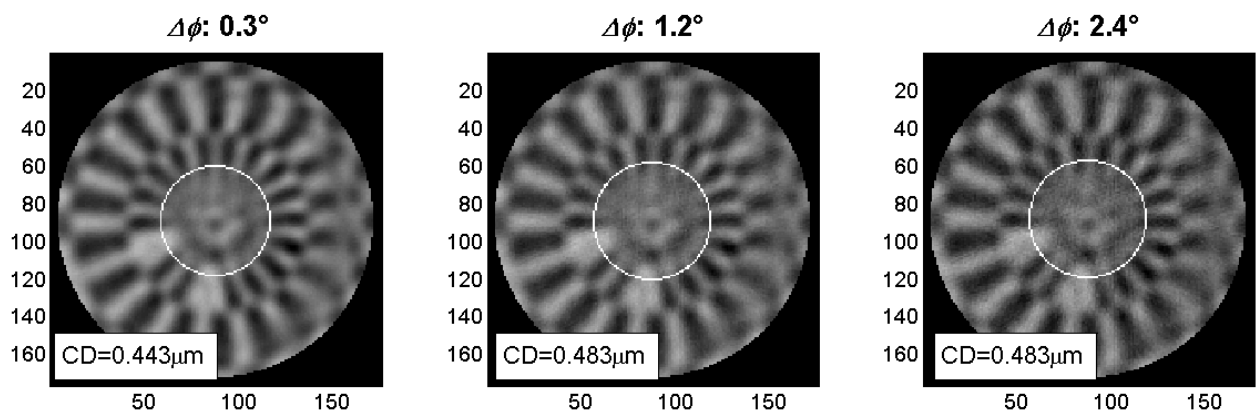


50. ábra: Mért, illetve számolt szinogramok és azok alapján rekonstruált képek összehasonlítása.

A számolt képen a kritikus méret $0,386\mu\text{m}$, míg a mért kép alapján a reflexiós TOM feloldása nem sokkal marad el a számolttól: $0,443\mu\text{m}$. A különbség a detektált intenzitás zajával, illetve a pásztázás és forgatás reprodukálhatóságának korlátosságával magyarázható.

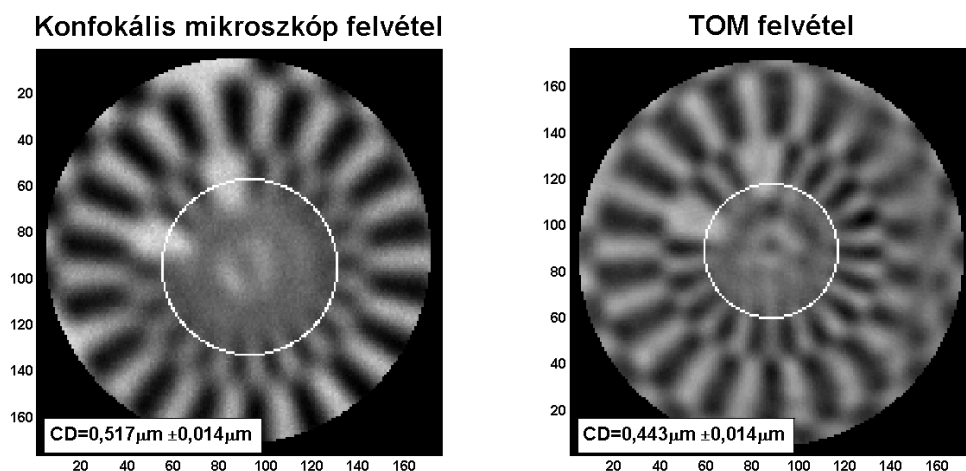
A korábbi fejezetekben világossá vált, hogy a rekonstruált kép kontrasztja és a rajta megjelenő információ Fourier komponensei annál nagyobbak, minél kisebb a pásztázó intenzitáseloszlás két szomszédos pozíciója közti távolság (Δr) és a pásztázás irányának szögelfordulása ($\Delta\phi$). A mérések során a Δr paramétert az optikai rendszer által limitált,

lehető legkisebbnek választottam ($0,041\mu\text{m}$), a szöglépés minimalizálásával azonban jelentősen megnőtt a mérési idő, a nagyszámú projekció-felvétel miatt. A megnövekedett mérési idő felerősíti a rendszer mechanikai és termikus instabilitásának hatását, így megvizsgáltam, hogy csökkentett számú projekció felvételével hogyan változik a keletkező kép minősége.



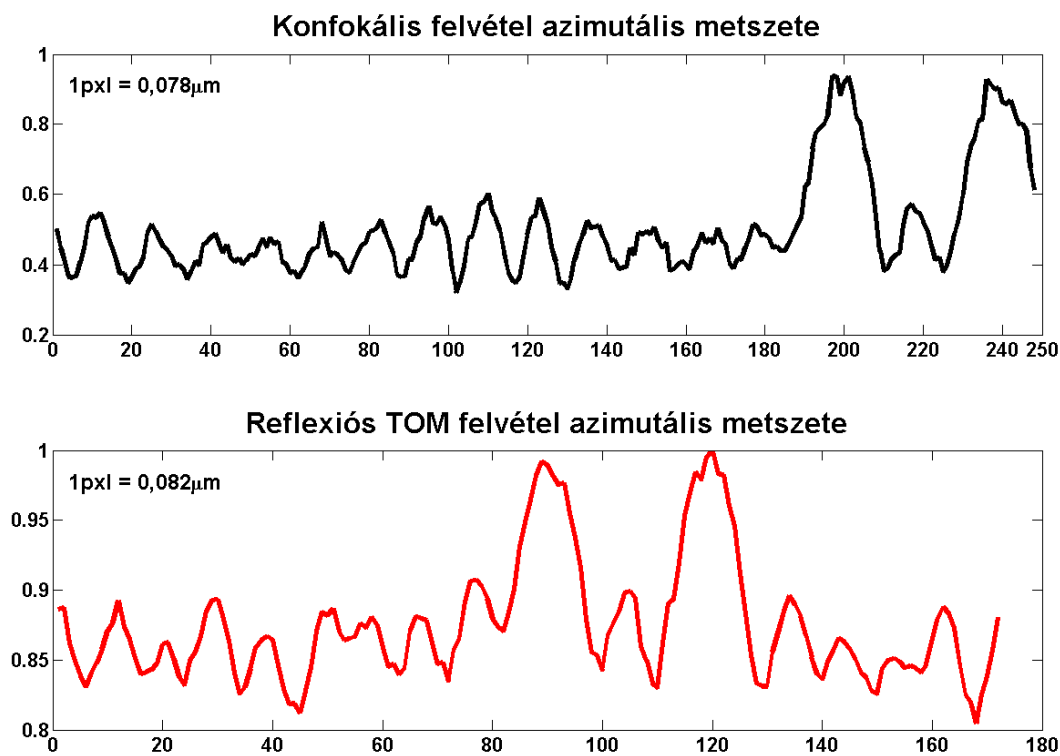
51. ábra: Képmínőség a mért projekciók számának függvényében.

Az 51. ábra három, különböző szöglépés ($0,3^\circ$, $1,2^\circ$ és $2,4^\circ$) mellett rekonstruált képet tartalmaz, melyeken megjelenő fehér kör a rendszer feloldásának határát jelöli. A legkisebb szöglépés mellett rekonstruált kép alapján megállapítható kritikus méret: $CD=0,443\mu\text{m}$, melynél valamivel nagyobb, a harmad annyi projekcióból rekonstruált kép kritikus mérete: $CD=0,483\mu\text{m}$. A projekciók számának csökkenésével a keletkező kép kontrasztja is csökken, így a számolt kritikus méret nő. A projekciók számának további csökkenése azonban a kritikus méretet nem, de a képen megjelenő zaj szintjét növeli.



52. ábra: Zeiss Axiovert 135M és reflexiós TOM által rögzített képek.

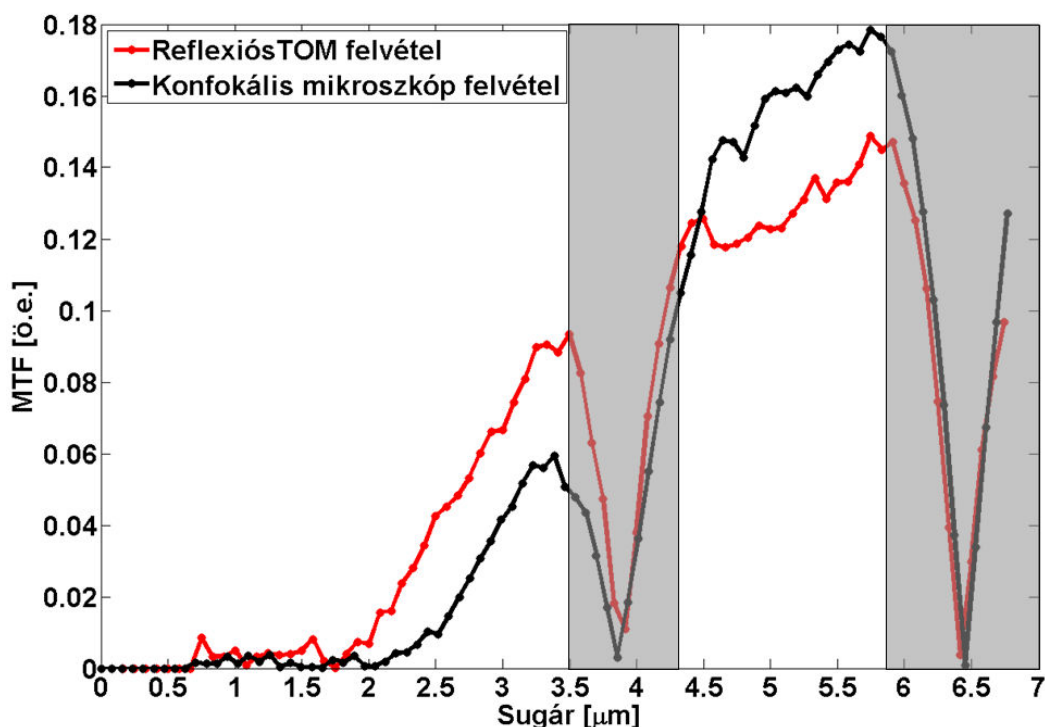
Azért, hogy a reflexiós TOM feloldását összehasonlítsam egy kereskedelmi forgalomban kapható mikroszkóppal, felvételeket készítettem a Richardson csillag ugyanazon tartományáról egy Zeiss Axiovert 135M konfokális mikroszkóppal. Mindkét rendszerben ugyanazt, a már korábban bemutatott objektívet használtam. A kivilágító hullámhosszak a két eszköz esetén 2%-ban eltértek egymástól. A reflexiós TOM-nál alkalmazott hullámhossz 532nm, míg a konfokális mikroszkóp esetén 543nm volt. Az összehasonlító felvételek, melyek a Richardson csillag (kívülről) második és harmadik gyűrűjéről készültek, az 52. ábrán láthatók. A TOM felvétel jobb szélén a karok kissé elmosódottak, ami annak a következménye, hogy a kivilágító csík hossza kisebb volt, mint a pásztázási tartomány. A tengelyhiba korrekció során a kép virtuális középpontja balra tolódott, így egyes projekciók nem hordoztak információt a minta jobb széléről. A képeken látható fehér körök itt is a helyes periódusszámú moduláció határát jelölik. A képek pixelmérete közel megegyező; a konfokális mikroszkóp esetén ez a méret $0,078\mu\text{m}$, míg a reflexiós TOM felvételen $0,082\mu\text{m}$. A két képalkotó rendszer feloldásának határa a képeken feltüntetett, fehér körök menti intenzitás görbék alapján lett megállapítva. Ezek a görbék az 53. ábrán láthatók.



53. ábra: Konfokális mikroszkóp és reflexiós TOM felvételek azimutális metszete feloldás határkörén.

Amennyiben a képeken jelölt fehér kör sugarát egy pixellel kisebbre veszem, a körök menti metszeteken a szeletek egyes periódusai teljesen összemosódnak. Ennek értelmében a fehér körök a feloldás határát jelölik, melyek mentén leolvasható a szeletek fél periódusához tartozó kritikus méret. A konfokális mikroszkóp felvételén és metszetén látható, hogy a kör által jelölt határt egyes irányok mentén szűkebbre lehet venni, azaz az eszköz feloldása anizotrop. A reflexiós TOM felvételen ilyen effektus nem látható. A metszetek alapján a konfokális mikroszkóphoz tartozó kritikus méret $0,517\mu\text{m}\pm0,014\mu\text{m}$, míg a reflexiós TOM-hoz tartozó kritikus méret $0,443\mu\text{m}\pm0,014\mu\text{m}$.

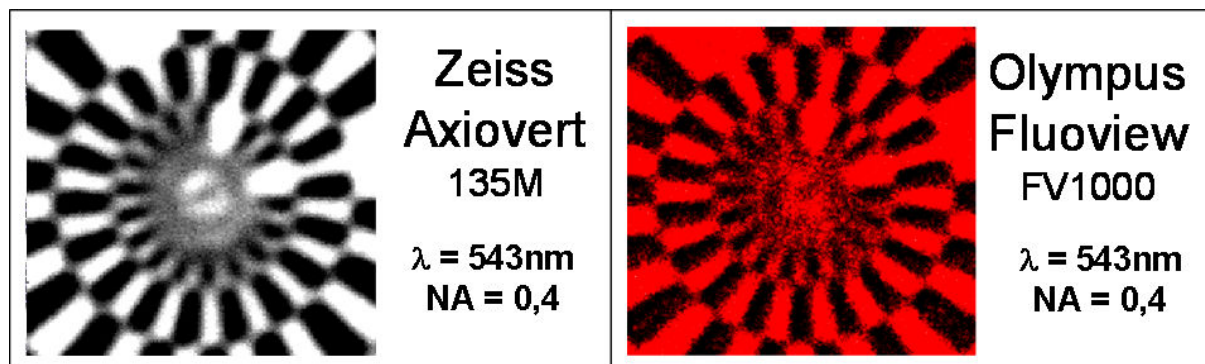
Az eszközök feloldásának összehasonlítására alkalmas az optikai rendszerek modulációs transzferfüggvénye (MTF). A függvény azt mutatja meg, hogy a rendszer a Fourier térben, a képi információ egyes frekvenciakomponenseit milyen mértékben képes közvetíteni. Az 52. ábra felvételeinek különböző sugarú metszeteit Fourier transzformáltam és számoltam a minta lokális periódushosszához tartozó karakterisztikus frekvenciák magnitúdóját. Ezt az értéket a sugár függvényében ábrázolva megadható a két eszköz modulációs transzferfüggvénye, ami az 54. ábrán látható.



54. ábra: Reflexiós TOM és konfokális mikroszkóp felvételei alapján készült modulációs transzferfüggvény.

A szürkével jelölt területek alatti pontok nem hordoznak releváns információt a rendszerről, mivel ezeknél a sugártartományoknál vált periódust a Richardson csillag két szomszédos

gyűrűje. A függvény alapján megállapítható, hogy a konfokális felvétel kontrasztja nagyobb a csillag külső régiójában, ám ez részben a TOM felvétel szélén látható homogén tartománynak köszönhető. A nagyobb frekvenciák, azaz a kisebb méretek felé haladva a reflexiós TOM modulációs értékei magasabbak, mint a konfokális eszközé, ami nagyobb kontrasztot, azaz jobb képminőséget jelent. A görbék alapján a konfokális mikroszkóp levágási frekvenciája alacsonyabb, mint a reflexiós TOM-é. Annak kiküszöbölésére, hogy a Zeiss Axiovert 135M konfokális mikroszkóp egyedi, vagy típushibái eltorzítsák a képminőség összehasonlításánál tett megállapításaimat, felvételt készítettem egy másik típusú (Olympus, FluoView FV1000), ugyancsak kereskedelmi forgalomban kapható konfokális berendezéssel. A korábbi esetekben használt objektívet és kivilágító hullámhosszt alkalmaztam a felvétel során.

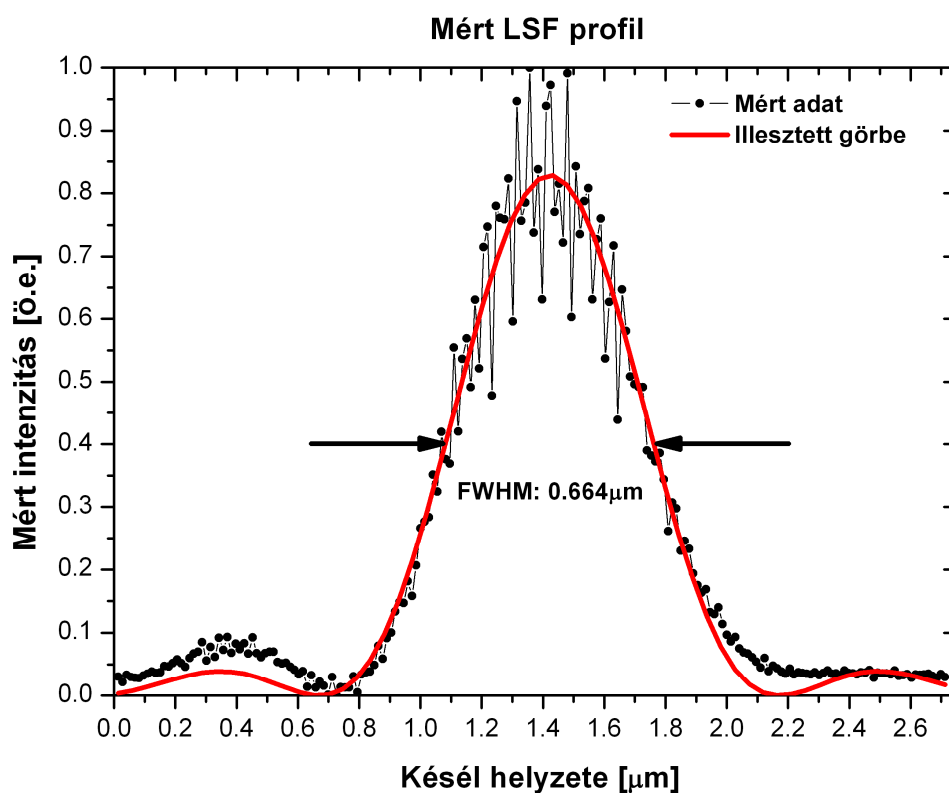


55. ábra: Felvételek a Richardson csillagról, két különböző típusú konfokális mikroszkóppal.

A kész kép alapján (55. ábra) meghatároztam a rendszer feloldását az előzőkkel megegyező módon. A rendszer által feloldható kritikus méret $0,84\mu\text{m}$ -nek bizonyult, ami még jobban elmarad a reflexiós TOM mért feloldásától.

Annak igazolására, hogy a reflexiós TOM feloldását valóban diffrakció limitált pásztázó kivilágítás mellett állapítottam meg, késéles módszerrel [50] megmértem az objektív által létrehozott intenzitáseloszlás keresztirányú profilját. Részapertúra esetén, aberrációmentes esetben, az elmélet szerint a keresztirányú intenzitásprofil sinc^2 függvény alakú. Az eloszlásprofil méréséhez egy nem áteresztő élel töltöttem fokozatosan a fénypáncsba, a fókuszsíkban és mértem az átjövő fényintenzitást. A mért görbe numerikus deriváltja adja a rendszer vonalátviteli függvényét, az ún. LSF-et, ami jelen esetben megegyezik a keresztirányú intenzitáseloszlással. A mért görbe az 56. ábrán látható. A mérési zaj miatt a profil maximuma nehezen megállapítható, így a nyers eredményre sinc^2 függvényt illesztettem. Diffrakció limitált esetben az illesztett görbe félértékszélessége (FWHM) meg kell egyezzen a (2.3)

összefüggésből számol mérettel. Ez az érték a mérés alapján $0,664\mu\text{m}$, míg az elmélet szerint $0,5 \cdot \lambda / \text{NA} = 0,665\mu\text{m}$ ($\lambda=532\text{nm}$, $\text{NA}=0,4$).



56. ábra: Reflexiós TOM mért, kivilágító intenzitáseloszlása.

A számolások és mérések eredményei alapján megállapítottam, hogy **reflexiós elrendezésben, nyalábforgatást alkalmazva a TOM feloldása meghaladja az azonos objektívvel rendelkező, piacon kapható konfokális mikroszkópok feloldóképességét.** Ez a feloldáskülönbség az apertúra függvény előnyös megválasztásának és a rekonstrukciós algoritmus által biztosított izotrop apertúrának együttes következménye.

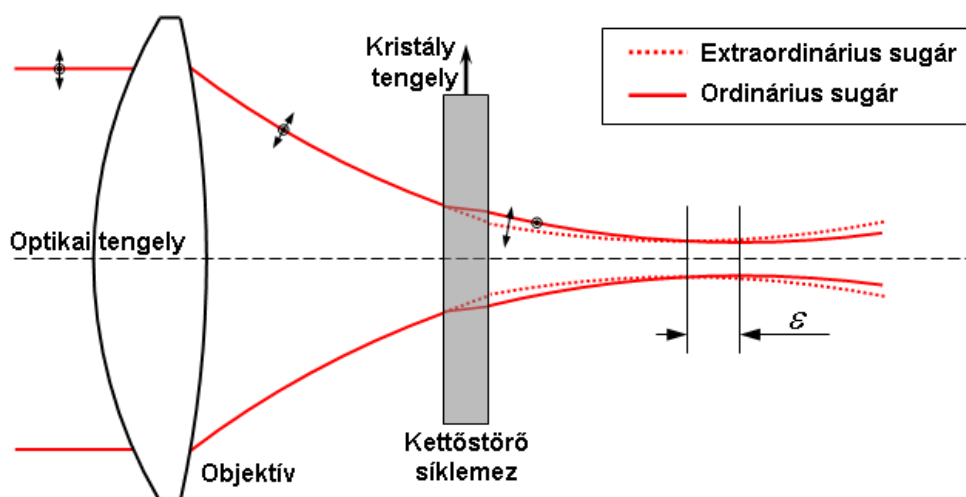
4.2 Intenzitásprofil manipulálása kettőtörő lemezzel

Mind a 2.1, mind az előző fejezetben leírtaknak megfelelően egy optikai képalkotó rendszer feloldása nagymértékben függ a vizsgált tárgy kivilágításának módjától, struktúrájától. A feloldási limit növelését célzó megoldások jelentős része a tárgyat megvilágító intenzitásprofil manipulálására irányul, annak érdekében, hogy a rendszer pontátviteli függvénye minél nagyobb frekvenciájú komponenseket tartalmazzon. A profil módosítása történhet például interferencia útján, vagy a minta speciális gerjesztésével (STED). Ilyen eszköz a reflexiós TOM is, mely a résnek választott kivilágító apertúrával módosítja a fókusz intenzitáseloszlását és izotróppá teszi a feloldást. A létrehozott intenzitásprofil alakja azonban függ a beeső fény polarizációjától is, ami passzív optikai elem – például kettőtörő kristálylemez – segítségével változtatható. Ideális polarizáció esetén a fókuszált intenzitásprofil félértékszélessége csökken, amit kihasználva akár a TOM elrendezések feloldása is tovább növelhető.

A fenti gondolatmenet alapján megvizsgáltam, hogyan módosítható egy kettőtörő kristálylemezzel egy pásztázó optikai rendszer kivilágító intenzitáseloszlása úgy, hogy az a rendszer képalkotási sebességének vagy feloldásának növelését eredményezze. Számolásokat végeztem annak megállapítására, hogy kettőtörő síklemezen átfókuszálva lehetséges-e két elkülönülő fókuszolt létrehozása az optikai tengely mentén, a beeső fény polarizációjának változtatásával. Ilyen lemezzel kiegészítve egy pásztázó konfokális mikroszkópot, vagy a reflexiós TOM-ot megoldhatóvá válik a minta két síkszeletének közel egyidejű képrekonstrukciója, a minta mechanikai mozgatása nélkül. Modelleztem és kísérletileg vizsgáltam, hogyan hozható létre kettőtörő, síkpárhuzamos lemezzel radiálisan és azimutálisan polarizált nyaláb, mely kisebb átmérőjű intenzitáseloszlást eredményez a képalkotó rendszer fókuszában. A modell készítése során azt találtam, hogy a kettőtörő lemez tengelyének előnyös megválasztásával, a rajta történő átfókuszálás során erős asztigmia lép fel a fókuszban, mellyel diffrakció limitált csík hozható létre a mintán. A lemez forgatásával a csík iránya is forog, de annak pozíciója nem változik a lemez laterális irányú elmozdulásával. Ilyen kettőtörő lemez használatával a reflexiós TOM elrendezésben jelentősen csökkenthető, vagy teljesen kiküszöbölhető a forgató mechanika szinkron és aszinkron hibája, így feleslegessé válik a projekciók helyzetének korrekciója. Eredményeimet az alábbi három fejezetben foglalom össze.

4.2.1 Fókuszszeparáció lineárisan poláros nyalábbal

Több módszer létezik, mely kettős fókusz előállításával egy optikai rendszer mélységélességének irányított növelését célozza. Ezek segítségével lehetséges egy minta különböző mélységű szeleteinek pásztázó mikroszkóppal történő leképezése, a minta mozgatása nélkül, vagy gyors információtovábbítás adattároló eszközök különböző rétegeibe [51]. Az elért mélységélesség növekedés mellett azonban lényeges követelmény, hogy a rendszer képalkotó minősége ne romoljon, vagy pontátviteli függvénye ne torzuljon. Optikailag anizotróp, vagy kettőtörő anyagból készített lencsékkel létrehozható megkettőzött fókusz [52][53], de ezeknek az elemeknek a csiszolása költséges és nehéz folyamat. Egyszerűbben kivitelezhető megoldás egytengelyű kristályból vágott, síkpárhuzamos lemezen történő átfókuszálás, ahol a keletkező fókuszok az ordinárius és extraordinárius sugármenetekhez tartoznak. Az optikai tengelyen kialakuló intenzitáseloszlás ezen sugármenetek inkoherens összege [54][55]. Ha lineárisan poláros kivilágító nyalábot egy olyan kettőtörő kristályon fókuszálunk át, melynek tengelye merőleges a rendszer optikai tengelyére (p-típus), akkor két fókusz gerjeszthető. Amennyiben a beeső nyaláb polarizációjának iránya párhuzamos a kristály tengelyével, extraordinárius terjedés lép fel melyhez az ún. extraordinárius fókusz tartozik. Ha a polarizáció irányát 90 fokkal elforgatjuk, akkor a sugármenet ordinárius és az ún. ordinárius fókusz jön létre. A két sugármenetet az 57. ábra szemlélteti.

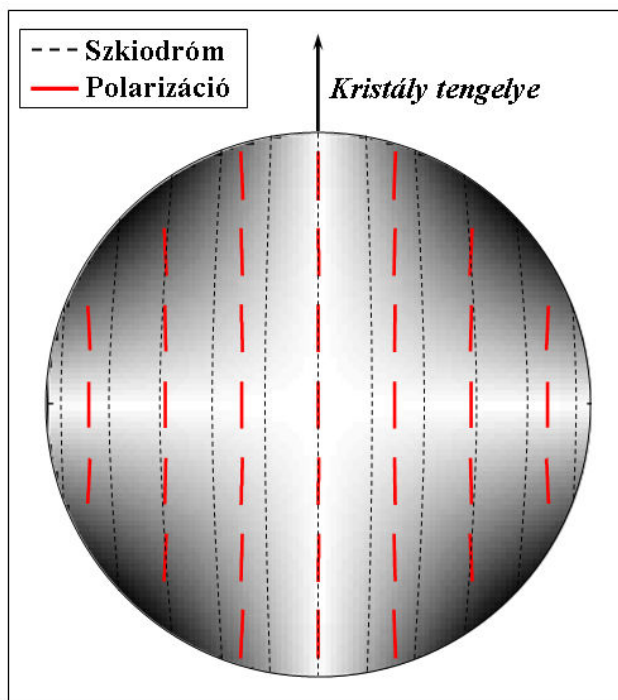


57. ábra: Kettőtörő, p-típusú kristályon történő átfókuszálás sugármenete.

Mivel a két különböző sugármenethez különböző fókusztávolság tartozik, így a kivilágító fény polarizációs irányának megváltoztatásával, változtatható egy képalkotó rendszer

fókusz síkjának pozíciója. Ez a megállapítás azonban csak akkor igaz, ha a fókuszáló rendszeren történő áthaladáskor a fény polarizációs iránya nem változik. Az is kérdés továbbá, hogy maga a kettőtörő lemez milyen és mekkora aberrációt okoz az ilyen optikai rendszerrel történő képalkotás során.

Egy mikroszkóp objektíven keresztülhaladó nyaláb polarizációs irányát az objektív elforgatja, méghozzá az elektromágneses mező apertúrához közeli pontjaiban, nagyobb mértékben [56]. Az objektív numerikus apertúrájának növelésével a forgató hatás mértéke is nő. Ennek szemléltetésére OSLO sugárkövető program segítségével kiszámoltam, hogyan néz ki egy közepes numerikus apertúrájú objektíven ($NA = 0,45$; $M = 20$) áthaladó nyaláb elforgatott polarizációjának eloszlása, az objektív kilépő apertúráján. Az elforgatott polarizációs irányt, az 58. ábrán, vastag vörös vonalak jelölik. A számolás során feltételeztem, hogy az objektív kilépő apertúrája és fókusz síkja között egy kettőtörő síklemez található a fényútban, melynek tengelye párhuzamos az apertúra síkjával. A beeső nyaláb polarizációját úgy választottam, hogy a teljes keresztmetszet mentén párhuzamos legyen a fókuszseparációt létrehozó kristály tengelyével.



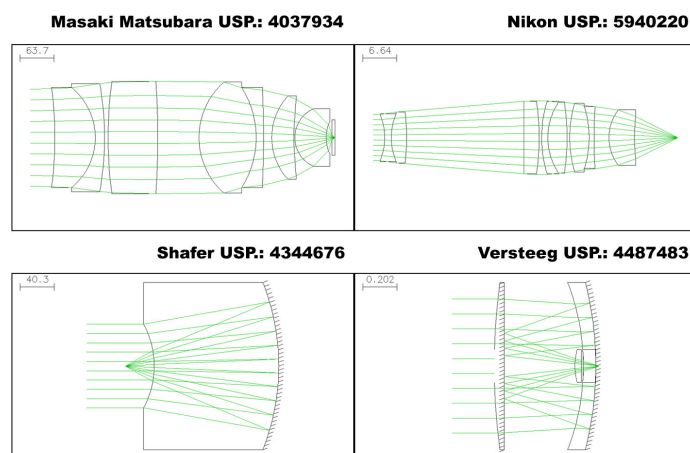
58. ábra: Objektív által elforgatott, lineáris polarizáció iránya (**vörös vonal**) és a fókuszban elhelyezett, extraordinárius esethez tartozó, pontszerű fényforrás polarizációjának merőleges vetülete a kilépő apertúrán (**fekete szaggatott vonal**).

Látható, hogy az objektív az apertúra széle felé dönti a polarizációs irányt, annak négy negyedéhez közeledve egyre nagyobb mértékben. A dőlés szöge enyhe, az apertúra széleinél

sem nagyobb 10° -nál, ami a modellhez választott lencserendszer jó minőségét bizonyítja. Az ábrán fekete szaggatott vonalak jelölik az extraordinárius fókuszban elhelyezett, pontszerű, lineárisan poláros fényforrás polarizációjának merőleges vetületét az objektív kilépő apertúrájának síkjára (szkiodróm). Ha az objektíven áthaladó fény polarizációjának iránya az apertúra minden pontjában megegyezik a szaggatott vonalakhoz húzott érintővel, akkor csak az extraordinárius fókusz jön létre. Hasonlóan, az ordinárius fókusz akkor gerjeszthető, ha rendszeren áthaladó fény polarizációja minden pontban merőleges az ábrán látható szkiodrómra. Ez azonban nem teljesíthető a rendszert homogénean kivilágító, horizontális vagy vertikális irányban poláros fénnel. Egyrészt a szkiodrómhoz húzott érintők kis mértékben az optikai tengely felé dőlnek, így a fókuszáló optikának is ebbe az irányban kellene forgatnia a polarizáció vektort, hogy az illeszkedjen a gerjesztéshez szükséges ideális irányra. Másrészt, a hagyományos objektívek éppen az ellenkező irányba forgatják el a beeső lineáris polarizációt. Legjobb esetben, a kiváló minőségű, feszültségmentes és antireflexiós réteggel ellátott objektívek változatlanul hagyják a polarizáció irányát, ami továbbra sem illeszkedik a szkiodrómra. A fentiek értelmében, vertikális vagy horizontális irány mentén, lineárisan poláros beeső fényt kettőstörő lemezen átfókuszálva, nem lehet szeparáltan gerjeszteni az ordinárius, vagy az extraordinárius fókuszt. Amennyiben a teljes szeparáció nem szükséges, a módszer használható mélységélesség növelésére, de a létrejövő intenzitáseloszlás a fókuszban torzul. Extraordinárius kivilágítást feltételezve, a kettőstörő kristály az objektív mögött analízátorként működik, így a rajta keresztülhaladó fény az apertúra negyedeinek szélén kis mértékben elnyelődik, ami megbontja a nyaláb hengerszimmetriáját. Ez az inhomogén intenzitáseloszlás, az ún. izogír látható az 58. ábra szürkeárnyalatú háttérében. A fehér rész a maximálisan áteresztett, míg a fekete rész a maximálisan elnyelt intenzitásokhoz tartozik. A rendszer numerikus apertúrájának növelésével a széleken az elnyelés nagyobb mértékű lesz. Az inhomogén kivilágítás következtében torzul a gerjesztett fókuszfolt alakja, valamint a sérült szimmetria miatt további optikai aberrációk jelennek meg a rendszerben, ami a képalkotó minőség romlását eredményezi.

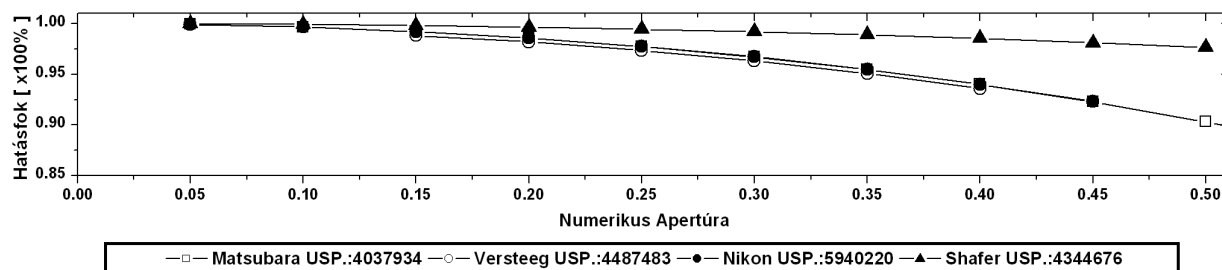
Annak megállapítására, hogy a módszert alkalmazva mekkora numerikus apertúrához milyen képminőség romlás tartozik, OSLO sugárkövető szoftverrel modelleztem négy, különböző típusú objektív polarizáció eloszlását és pontátviteli függvényük (PSF) torzulását. Az OSLO alkalmas, a Fresnel egyenletek figyelembevételével, polarizációs irány terjedésének a számolására, egytengelyű kristályok anyagán keresztül is [57]. A program Kirchhoff közelítéssel képes kiszámolni az intenzitáseloszlást a fókuszban, amivel megadható

a kétdimenziós PSF. Az optikai rendszer szférikus aberrációjának és asztigmatizmusának kvantitatív jellemzésére a szoftverből kinyerhetők a rendszer Zernike együtthatói.



59. ábra: Refraktív és katadioptriás objektívek szerkezeti rajza.

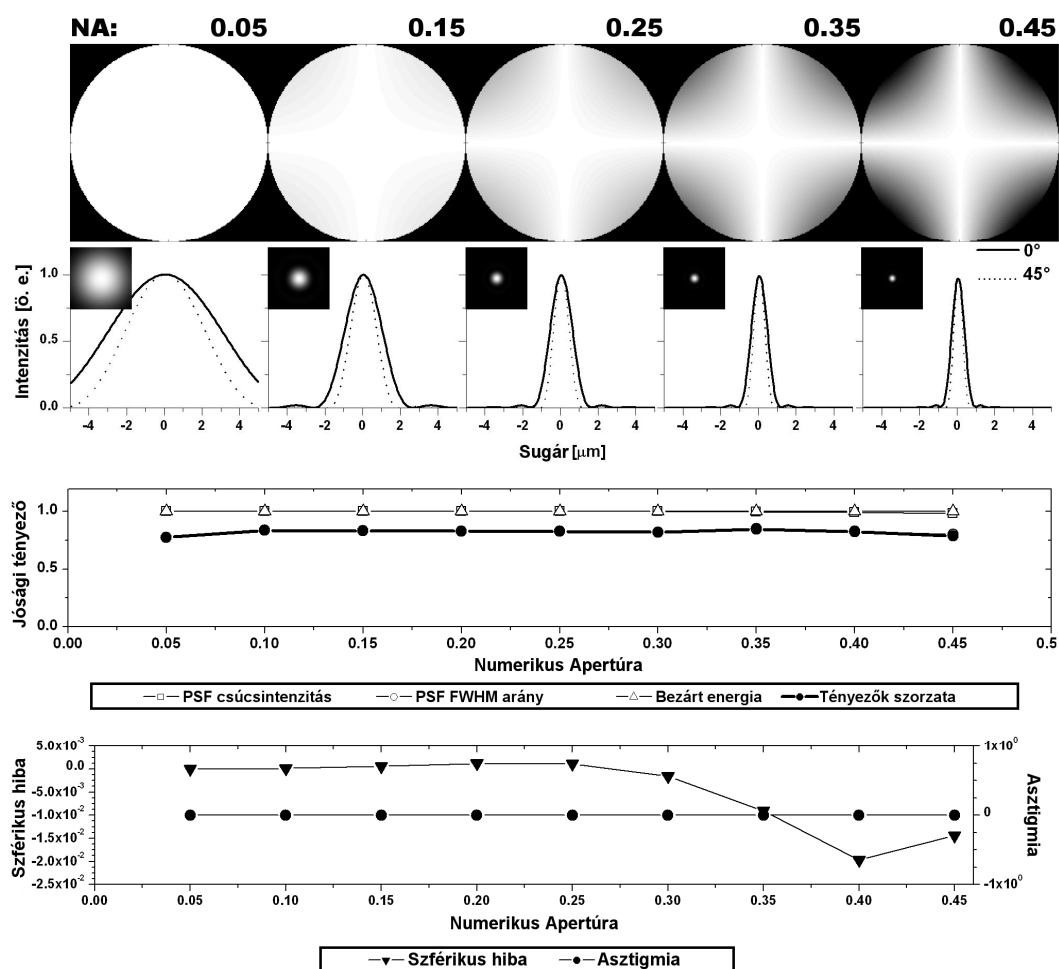
A számolások során vizsgált négy mikroszkóp objektív szerkezeti felépítését az 59. ábra mutatja. Ezek közül kettő hagyományos, refraktív optikai elem, míg a másik két elrendezés katadioptrikus. Az első objektív egy Olympus gyártmányú, nagy numerikus apertúrájú lencserendszer (Matsubara; $NA = 0,95$), melynek nyalábmenete nem korrigálható fedőlemezre. A második egy közepes numerikus apertúrájú, de változtatható, 0–2mm vastagságú fedőlemezre korrigálható objektív (Nikon; $NA = 0,45$). A katadioptrikus rendszerek NA-ja rendre 0,5 és 0,45. Először azt vizsgáltam, hogy a különböző objektívek hogyan forgatják a rajtuk keresztülhaladó fény polarizációját és az elforgatott polarizációs irány mennyire tér el az extraordinárius (horizontálisan poláros beeső nyaláb esetén az ordinárius) fókusz gerjesztéséhez szükséges iránytól.



60. ábra: Polarizációs hatásfok a numerikus apertúra függvényében.

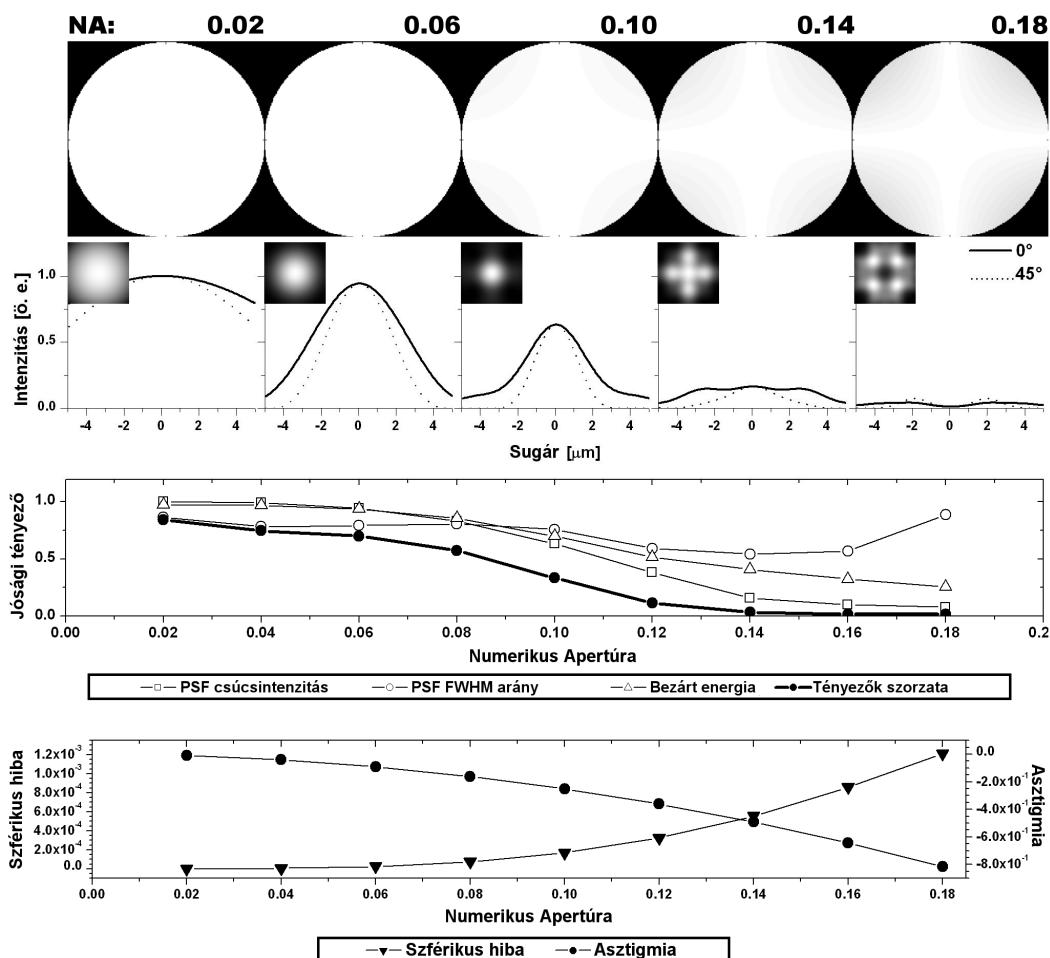
Ennek számszerű megadására a polarizációs irányok és a gerjesztéshez tartozó szkiodróm érintők térbeli eloszlásának átfedési integrálját számoltam. Ez az érték egységnyi, ha a polarizáció ideális a teljes kivilágított apertúra mentén. A négy optikai rendszerre számolt

integrálok értékeit (polarizációs hatásfokát) mutatja a 60. ábra, a rendszer részleges kivilágításával változtatott numerikus apertúra függvényében. Három objektív polarizációs hatásfoka (Matsubara, Versteeg és a Nikon) gyakorlatilag azonos mértékben csökken a numerikus apertúra növelésével. A teljes apertúrát kivilágítva ($NA = 0,5$) a maximális fényvesztés 10% körüli. Ugyanez az érték a Schafer katadioptriás rendszer esetén csak 2%, mivel ez az objektív – a szkiodrómhoz hasonlóan – az optikai tengely irányába forgatja a polarizációt. Az eredmények alapján akár hagyományos, akár katadioptriás optikát használva, $0,5NA$ -ig az intenzitásvesztés 2-10% között van, ami elfogadható mértékűnek tűnik. Ez a veszteség azonban nem egységes az apertúra síkjában, ami a fókuszolt alakjának torzulását, valamint asztigmia és szférikus hiba megjelenését eredményezi. Ennek következtében a módszer gyakorlati alkalmazását nem a fényvesztés, hanem a sérült hengerszimmetriából eredő optikai aberráció limitálja, ami leírható a rendszer PSF-jének alakváltozásával.



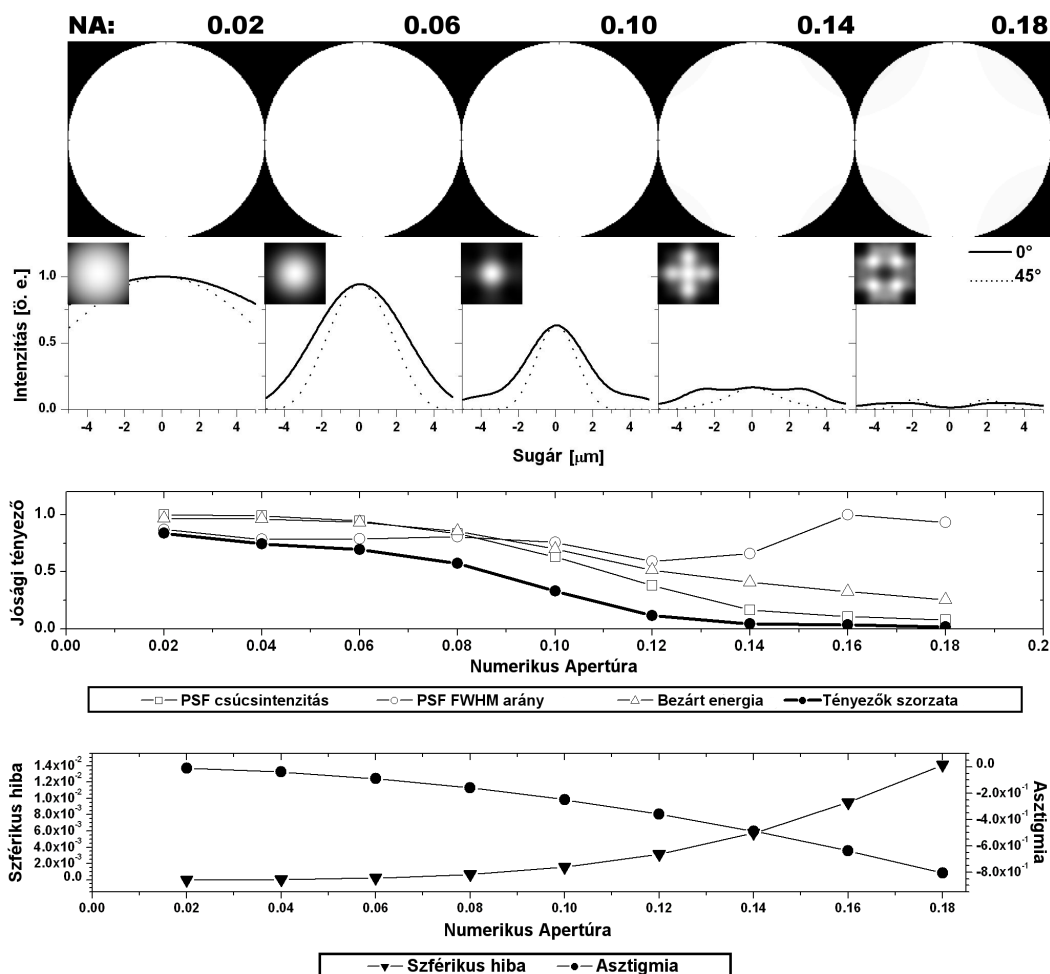
61. ábra: Pontátviteli függvény vizsgálata 500 μm vastag BK7 üveglemez esetén.

A korábban modellezett négy objektív közül kettőnek vizsgáltam a kettőtörő síklemezen történő átfókuszálás miatt megváltoztatott pontátviteli függvényét. A refraktív objektívek közül a Nikon-t választottam, mivel az a síklemez által okozott szférikus hiba kompenzálására alkalmas, lencsetávolságot változtató mechanikát tartalmaz. A katadioptriás rendszerek közül a Schafer-re esett a választás, mert a korábbi számolások eredménye szerint ez az objektív rendelkezik a legkisebb inhomogén transzmissziós veszteséggel. Ahhoz, hogy a kettőtörő lemez anizotrop közegének hatását összehasonlíthassam egy hasonló tulajdonságú, de izotróp lemezével, először egy BK7 síkpárhuzamos üveglapon átfókuszált pontátviteli függvényt vizsgáltam. A számolás során a fókuszálást végző objektív mögé egy analizátort helyeztem, mely az extraordinárius esethez tartozó polarizációs irányt engedte át a rendszeren. A különböző numerikus apertúrához tartozó és az analizátor síkjában számolt intenzitáseloszlások, valamint a hozzájuk tartozó pontátviteli függvény a 61. ábra első két sorában látható.



62. ábra: Pontátviteli függvény vizsgálata 500 μm vastag kalcitlemez esetén, Nikon objektív használatával.

Az NA növelésével, az apertúra négy sarkában egyre erősebb az intenzitásvesztés, ennek ellenére nem látható jelentős torzulás a fókuszolt alakjában, bár a 0° és 45° -hoz tartozó intenzitás metszetek (második sor, folytonos és szaggatott vonalak) eltérnek, ami optikai aberrációra utal. A PSF minőségének kvantitatív jellemzésére bevezettem három jósági tényezőt (harmadik sor) és kiszámoltam a szférikus hiba, valamint az asztigmia mértékét (negyedik sor). A PSF csúcshintenzitása, más néven Strehl aránya megadja a pontátviteli függvény intenzitásmaximumának csökkenését, míg a különböző tengelyen vett metszetek félértékszélességének aránya (FWHM arány) a fókuszolt alakjának torzulására utal. A bezárt energia, egy adott sugarú körben lévő összintenzitást jelöl, ami azt mutatja meg, milyen mértékben terül szét a fényenergia a fókuszban. A BK7 üveglap esetén a csúcshintenzitás és a bezárt energia egységnyinek lett választva, ami a későbbi elrendezéseknél referenciaként szolgál. Az FWHM arány ideális hengerszimmetria esetén 1. A felsorolt jósági tényezők szorzata szintén fel lett tüntetve az ábrán.



63. ábra: Pontátviteli függvény vizsgálata 500 μm vastag kalcitlemez esetén, Schafer objektív használatával.

A számolt görbék alapján megállapítható, hogy a fókuszáló objektív sikeresen kompenzálja az üveglap által bevezetett szférikus hibát, ami a modellezett eszköz jó minőségére utal.

A kettőtörő, síkpárhuzamos lemez hatásának elemzéséhez kiválasztottam az egytengelyű kristály anyagát és vastagságát. A gyakorlati felhasználhatóság feltételének eleget téve, masszív anyagszerkezetű kristály szükséges, hogy abból megfelelően nagyméretű lemezt lehessen csiszolni törés nélkül. További feltétel, hogy az anyag a látható fénytartományban transzparens legyen. A fókuszpontok kellő térbeli szeparációját erősen kettőtörő kristállyal lehet megvalósítani, azaz az ordinárius és extraordinárius törésmutató közötti különbség nagy kell legyen. Ekkor olyan vastagságú lemez választható, amely által létrehozott optikai aberrációt a modellezett Nikon objektív még képes korrigálni (fedőlemez vastagság: 0–2mm). Ezeket a feltételeket figyelembe véve a választás a kalcitra esett, ami egy negatív kettőtörő anyag melynek törésmutatói, 660nm hullámhosszon: $n_o = 1,654$; $n_e = 1,484$. A lemez vastagságát 500 μ m-nek választottam, mivel ez beleesik a Nikon objektív által korrigálható vastagságtartományba. Az ennél vékonyabb kalcitlemez azonban törékeny. A kalcitlemezzel, valamint a Nikon és Schafer objektívekkel kombinált optikai rendszerek PSF tulajdonságai és jósági tényezői láthatók a 62. és 63. ábrán. A számolás során a numerikus apertúrát 0,18-ig növeltem, mivel ezen érték fölött, mindkét rendszer felismerhetetlenül eltorzítja a fókuszt. A katadioptrikus Schafer objektív jobb polarizációs hatásfoka ellenére, nem mutatkozik lényeges eltérés a két rendszer PSF vizsgálatának eredményében. Mindkét esetben jelentősen torzul a PSF 0,1NA fölött, bár az apertúra kitöltés a Schafer objektív esetén homogénebb. A Nikon optika fedőlemez korrekcióval van ellátva, minek következtében a rendszerben közel egy nagyságrenddel kisebb a szférikus hiba. Habár a Schafer objektív esetén az asztigmia mértéke kisebb, ez a különbség nagyon csekély. Ez alapján megállapítható, hogy az optikai rendszer pontátviteli függvényének romlását elsősorban nem az inhomogén kivilágítás eredményezi, hanem a kettőtörő lemez által bevezetett fázistorzítás.

A számolás eredményei rámutattak, hogy kettőtörő lemezen, vertikálisan vagy horizontálisan poláros nyalábbal átfókuszálva nem gerjeszthető teljesen külön az ordinárius és extraordinárius fókusz [58]. A fókuszáló optika által elforgatott polarizációs irány nem egyezik a szeparált gerjesztéshez szükséges iránnyal. A kettő közti különbség speciális objektív segítségével csökkenthető, minek következtében javul a polarizációs hatásfok, de a numerikus apertúrát növelve a rendszer PSF-je ilyenkor is nagymértékben torzul. Adott lemezvastagság mellett megadható az a numerikus apertúra határ, melynél a

torzulás mértéke elhanyagolható (jelen esetben: $NA < 0,1$), de a gyakorlatban ez az érték túl alacsony ahhoz, hogy nagy felbontású képalkotó rendszerekben a módszert alkalmazni lehessen.

4.3.2 Radialisán poláros nyaláb előállítása kettőtörő lemezzel

Kettőtörő lemezen történő átfokuszálás a fókuszok szeparációján, vagy a mélységélesség növelésén túl, a PSF félértékszélességének csökkentésével is hozzájárulhat egy képalkotó rendszer minőségének javításához. A ponttal pásztázó konfokális mikroszkóp, vagy a reflexiós TOM feloldása függ a kivilágító optika által létrehozott fókuszolt, vagy diffrakció limitált csík kiterjedésétől. A mintát kivilágító fény polarizációjának megválasztásával lehetséges a fókuszban létrejött intenzitáseloszlás félértékszélességének csökkentése, ahogy azt a 2.6.1 fejezetben leírtam. Hengerszimmetrikus intenzitáseloszlás esetén az ideális nyalábpolarizáció is hengerszimmetrikus, azaz jobb feloldás eléréshez radiálisan, vagy azimutálisan poláros kivilágító nyalábra van szükség. Hengerszimmetrikusan poláros nyaláb előállítására számos lehetőség kínálkozik, de ezek többsége összetett optikai elrendezést igényel. Radiális, vagy azimutális polarizátor (RAP) azonban egyszerűen megvalósítható, megfelelő optikai tengellyel rendelkező, kettőtörő kristálylemezen átfokuszálva. Bár reflexiós TOM esetén a mintán létrehozott intenzitáscsík nem hengerszimmetrikus, a jól megválasztott polarizációs irány ebben az esetben is csökkentheti a diffrakció limitált csík keresztirányú méretét. Ennek kihasználása azonban távlati cél, először a kettőtörő lemezt tartalmazó radiális és azimutális polarizátor működését szerettem volna megvizsgálni.

Egytengelyű, anizotrop kristályon átfokuszálva ordinárius és extraordinárius fókuszok keletkeznek. A fény polarizációja a két fókuszban függ a kristály optikai tengelyének és a fókuszáló rendszer optikai tengelyének egymáshoz viszonyított irányától. Amennyiben a kristály tengelye merőleges annak felületére, azaz épp a fókuszáló rendszer optikai tengelyébe esik, az ordinárius és extraordinárius fókuszban azimutálisan és radiálisan poláros nyaláb jöhet létre. Térszűrővel az egyik fókusz leválasztható és a kívánt polarizációjú nyaláb pontszerű fényforrásként használható. Ahhoz, hogy a térszűrő sikeres legyen, a két fókuszhoz jól elkülöníthetőnek kell lenni az optikai tengely mentén. A fókuszok szeparációja (ε) az alkalmazott kettőtörő lemez vastagságától és kettőtörésének erősségétől (δn) függ. Utóbbi az ordinárius és extraordinárius törésmutatók relatív különbségével definiálható, $\delta n = (n_e - n_o) / n_o$ [59]. Erősen kettőtörő, illetve vastagabb kristálylemez esetén nagyobb a szeparáció, ami optikai sugárkövető szoftverrel számolható. Néhány, széles körben

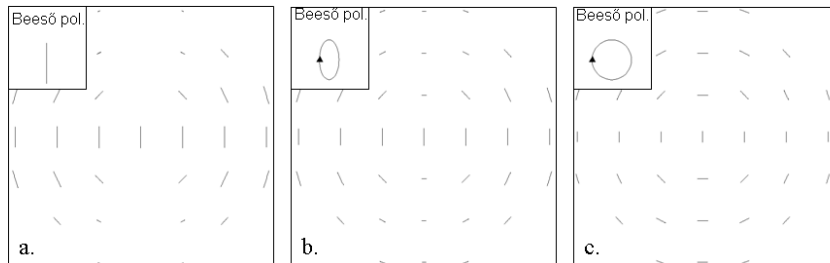
alkalmazott kettőtörő anyag törésmutatóját és OSLO-val számolt fókusz szeparációját tartalmazza a Táblázat 1, 532nm-es kivilágító hullámhossz és 0,45NA-jú objektív esetén.

<i>Anyag</i>	n_o @ 532nm	n_e @ 532nm	δn @ 532nm	$\varepsilon (mm)$ @ 0,5mm lemezvastagság	$\varepsilon (mm)$ @ 1mm lemezvastagság
Kalcit [57]	1,6629	1,4885	-0,1049	0,0737	0,1474
LiNb [60]	2,323	2,234	-0,0383	0,0169	0,0338
KDP [61]	1,5129	1,4709	-0,0268	0,0190	0,0380
Kvarc [62]	1,547	1,556	+0,0058	0,0037	0,0074
MgF ₂ [62]	1,379	1,391	+0,0087	0,0062	0,0125

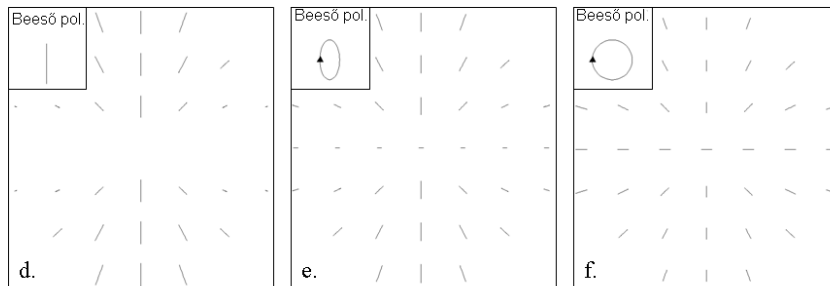
Táblázat 1: Kettőtörő anyagok tulajdonságai.

A továbbiakban kalcit és LiNb kristályokból készült lemezen történő átfókuszálással foglalkozom, mivel velük kiválóan szemléltethető egy erősen és egy közepesen kettőtörő anyag viselkedése. Az előző fejezetben bemutatott, változtatható fedőlemez korrekcióval rendelkező Nikon objektív (NA = 0,45; M = 20; F.k. = 0–2mm) modelljét átvilágítva, kiszámoltam 1mm vastag kalcitból készült lemez mögötti síkban a nyaláb polarizációjának eloszlását. Az eredmények a 64. ábrán láthatók.

Ordinárius sugár



Extraordinárius sugár

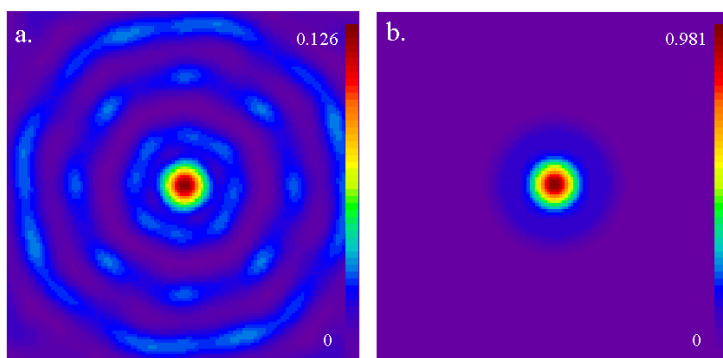


64. ábra: Polarizáció eloszlás 1mm vastag kalcitlemez mögött ($\lambda=532\text{nm}$, NA = 0,45).

A beeső fény hullámhosszát 532nm-nek választottam és változtattam annak polarizációját lineáris és cirkuláris állapotok között. Az (a.) és (d.) ábrákon tökéletesen lineáris bemenő

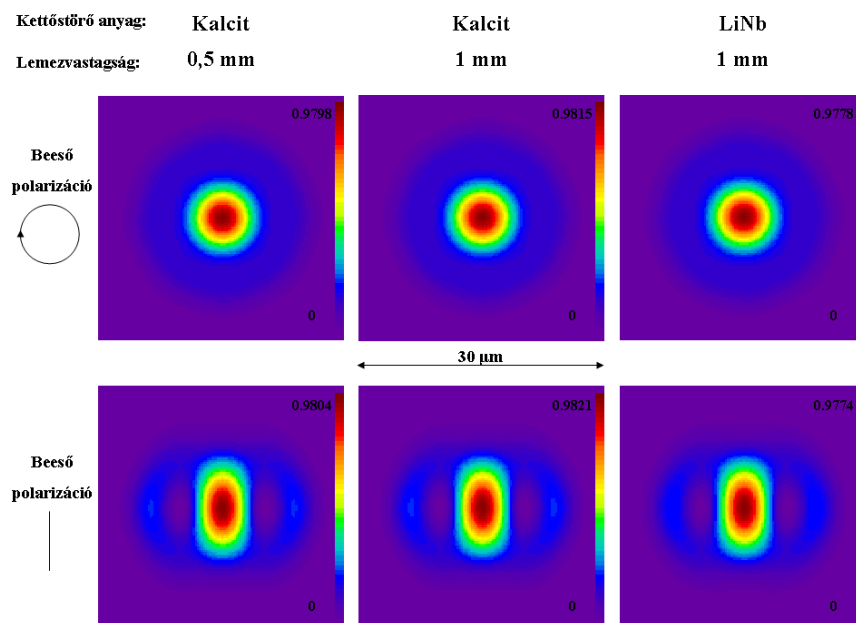
nyaláb melletti eloszlás látható, míg a (c.) és (f.) eloszlások esetén a beeső polarizáció tökéletesen cirkuláris volt. A cirkuláris esethez tartozó eloszlás teljesen hengerszimmetrikus, az ordinárius nyalábmenet azimutális, míg az extraordinárius nyaláb radiálisan poláros. A lineáris és elliptikus gerjesztéshez tartozó eloszlás szimmetriája sérül, aminek nyoma kell legyen a fókuszok alakján. LiNb kristálylemez esetén az eredmény szinte teljesen megegyező.

Az átfókuszálás során a kettőtörő síkpárhuzamos lemez optikai aberrációt hoz létre, melynek mértéke jelentősen csökkenthető fedőlemezre korrigálható objektívvel. Az általam használt Nikon objektív változtatható lemezvastagság mellett végez korrekciót. Az objektív modelljében két lencsecsoport közti távolság változtatható, ami a különböző vastagságú fedőlemezek által bevezetett hiba korrekciójának felel meg. A számolások során ezt a távolságot az OSLO segítségével optimalizáltam. Beállítottam a különböző anyagú kristályok ordinárius és extraordinárius törésmutatóinak átlagát valamint a lemezvastagságot és a szoftver változtatta a lencsecsoportok közti helyet, úgy hogy a fókusz síkban a sugarak optikai úthosszkülönbségének szórása minimális legyen.



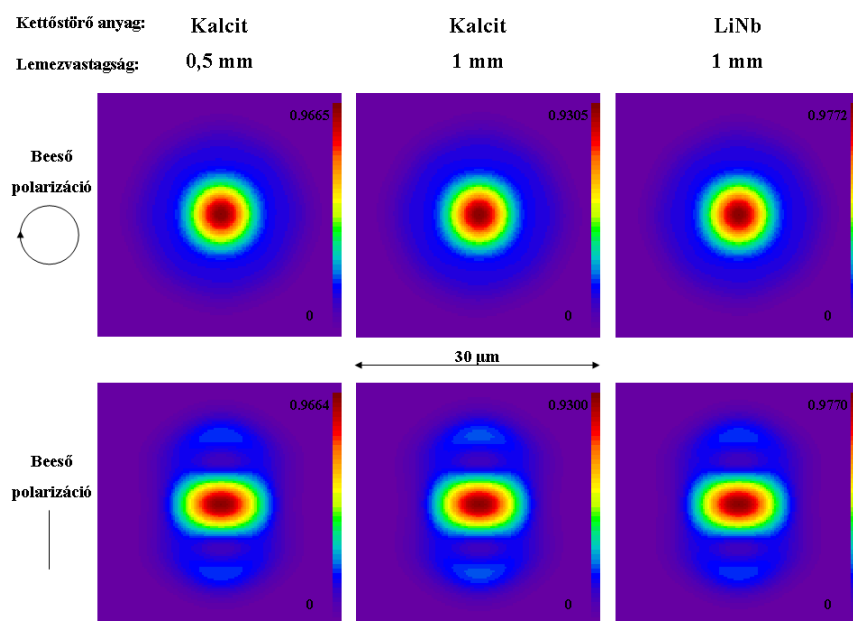
65. ábra: Ordinárius fókusz intenzitáseloszlása, cirkulárisan poláros beeső nyaláb és 1 mm vastag kalcitlemez esetén, (a.) fedőlemez korrekció nélkül és (b.) fedőlemez korrekcióval.

A 65. ábrán cirkulárisan polarizált beeső nyaláb ordinárius fókusza látható, fedőlemez korrekcióval és korrekció nélkül, 1mm vastag kalcitlemez mögött. Látható, hogy korrekció nélkül a fény jóval nagyobb területen oszlik el. Mivel erősebben kettőtörő lemez esetén a korrekció nélkül és azzal számolt foltok között tovább nő a különbség, a további számolásokat mind az OSLO által optimalizált fedőlemez korrekcióval végeztem. A polarizáció eloszláson túl a RAP minőségét a fókuszfolt alakja is befolyásolja, így kiszámoltam a 64. ábrán feltüntetett esetekhez tartozó intenzitáseloszlásokat a fókuszban. Két különböző kettőtörő anyag és két eltérő lemezvastagság mellett számolt ordinárius és extraordinárius fókuszok láthatók a 66. és 67. ábrákon. Mindkét sugármenetnél lineárisan és cirkulárisan polarizált beeső fénnel számoltam.



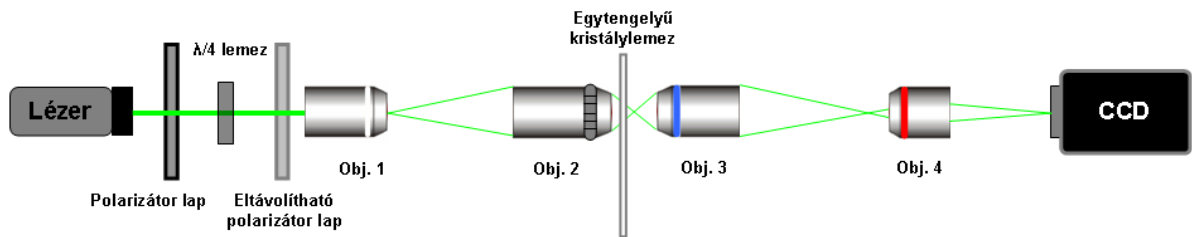
66. ábra: Intenzitáseloszlás az ordinárius fókuszban különböző anyagú, kettőtörő síklemezek mögött. A polarizáció azimutálisan szimmetrikus.

Az ábrák első sorában látható intenzitáseloszlások a cirkulárisan poláros, míg a második sorban látható eloszlások a lineárisan poláros kivilágító nyalábhoz tartoznak. Hengerszimmetrikus bejövő polarizáció esetén az eredő eloszlás is hengerszimmetrikus, mind az ordinárius, mind az extraordinárius fókuszban. Ha a bejövő polarizáció lineáris, a fókuszfolt alakja torzul, ami összhangban van a korábban számolt, kimenő polarizáció eloszlásokkal.



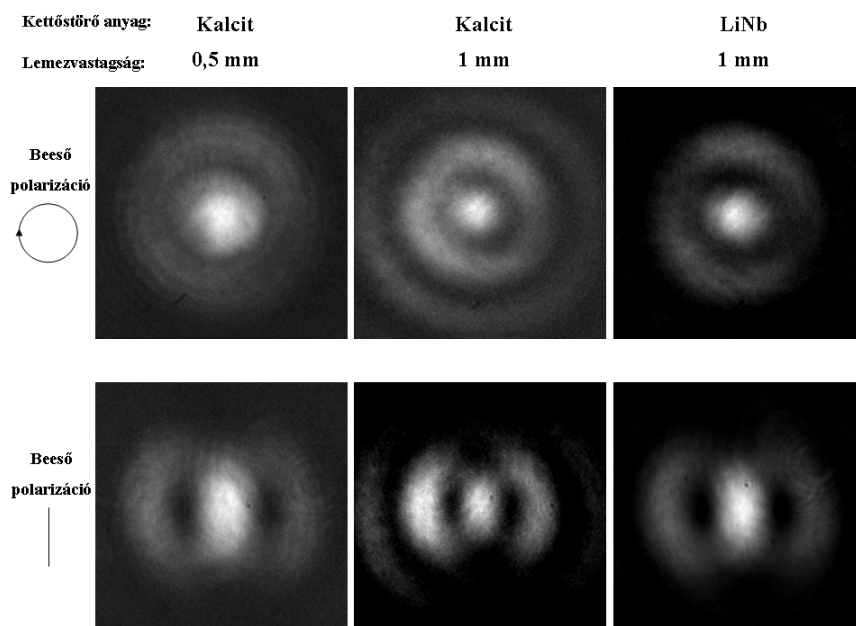
67. ábra: Intenzitáseloszlás az extraordinárius fókuszban különböző anyagú, kettőtörő síklemezek mögött. A polarizáció radiálisan szimmetrikus.

Annak megállapítására, hogy a kettőtörő lemezt tartalmazó RAP által létrehozott fókuszok számolt intenzitáseloszlásai mennyire fedik a valóságot, felépítettem egy RAP-ot tartalmazó optikai elrendezést. Az elrendezés alkalmas a radiális és azimutális polarizátor által létrehozott fókuszok direkt vizsgálatára. Szerkezeti vázlata a 68. ábrán látható.



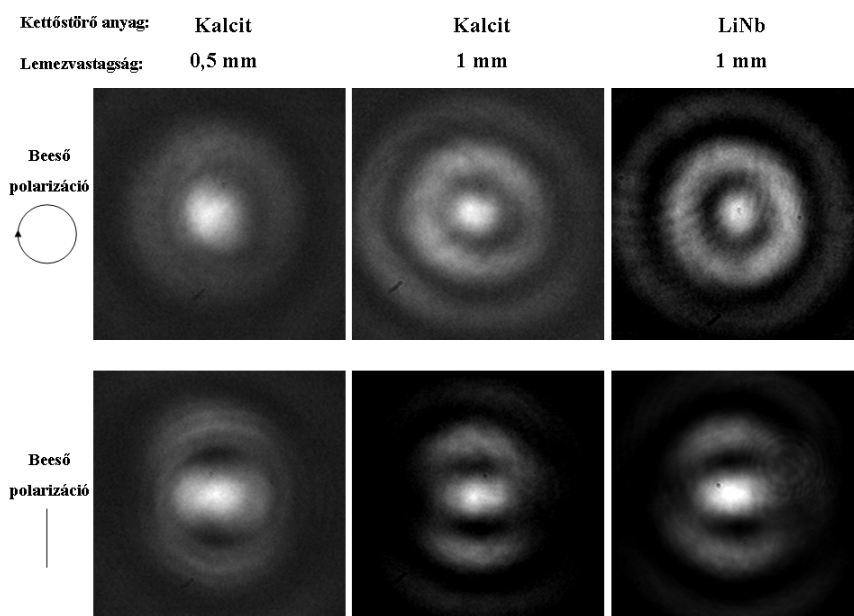
68. ábra: RAP kísérleti elrendezés szerkezeti vázlata.

A számolásokkal összhangban, egy 532nm hullámhosszon sugárzó, frekvenciakétszerezett Nd:YAG lézert használtam fényforrásként. A nyaláb polarizációját egy vékony polarizátor lap és egy $\lambda/4$ lemez segítségével állítottam cirkulárisan polárosra, vagy egy újabb, de eltávolítható polarizátor lappal lineárisan polárosra. A lézer kollimált nyalábját egy nagy numerikus apertúrájú objektívvel (Obj. 1) fókuszáltam, így az a továbbiakban pontszerű fényforrásnak tekinthető.



69. ábra: Mért intenzitáseloszlás az ordinárius fókuszban. A polarizáció azimutálisan szimmetrikus.

A széttartó és polarizált nyalábot fókuszáltam keresztül különböző anyagú és vastagságú kettőtörő lemezeken, a korábban ismertetett Nikon objektív segítségével (Obj. 2). A létrejött fókuszokat a 3. és 4. objektívekkel felnagyítottam és egy CCD kamera felületére képeztem.



70. ábra: Mért intenzitáseloszlás az extraordinárius fókuszban. A polarizáció radiálisan szimmetrikus.

Az ordinárius és extraordinárius fókusz felvételéhez a leképező optika és a CDD kamera az optikai tengely mentén mozgatható volt egy differenciális eltoló segítségével, melynek legkisebb lépéstávolsága $0,5\mu\text{m}$. A fókuszpozíció meghatározása a CCD felvétel alapján történt, a folt kiterjedésének minimuma és fényességének maximuma figyelembe vételével. A felnagyított és rögzített ordinárius és extraordinárius fókuszok a 69. és 70. ábrán láthatók, 0,5mm és 1mm vastag kalcit, valamint 1mm vastag LiNb lemezt alkalmazva. A mért eloszlások jó egyezést mutatnak a számolt eredményekkel. A differenciális eltoló segítségével megmértem a távolságot az azimutális és radiális fókuszok között, mely a 0,5mm és 1mm vastag kalcitlemez esetén 0,079mm és 0,158mm-nek adódott. Ez az érték az 1mm vastag LiNb lemezt használva, 0,040mm volt. A mért távolságok jól illeszkednek a táblázatban feltüntetett, számolt értékekre. A csekély eltérés oka, a fókuszpozíció vizuális meghatározásából eredő beállítási pontatlanság.

Az irodalomban felelhető, radiálisan és azimutálisan poláros fókuszált nyalábok intenzitáseloszlása közepén egy kör alakú sötét terület figyelhető meg [36]. Ez a RAP esetén nem látható, sem a számolások, sem a mérések során. Ennek feltétele, hogy egy adott időpillanatban, a fókuszsík radiális irányú metszetei mentén, az origótól egyenlő távolságra lévő

pontok polarizációja épp ellentétes irányba mutasson. Azaz érvényes legyen az alábbi összefüggés:

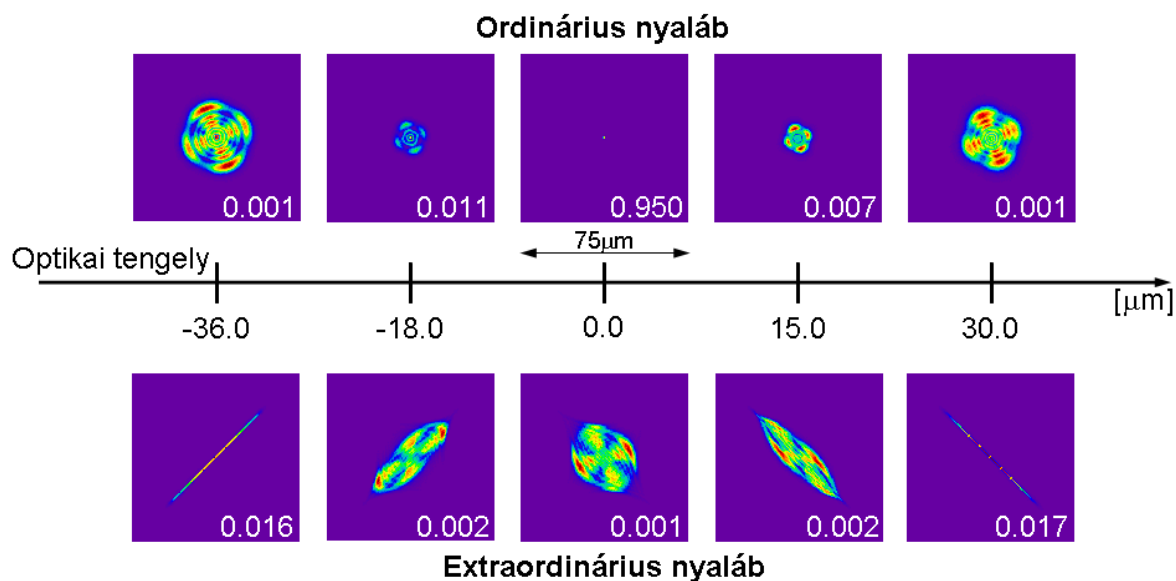
$$Q = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \varphi(\theta) d\theta = 1, \quad (4.1)$$

ahol Q a fázisviszonyt jellemző topológiai konstans, φ a polarizáció fázisa és θ az azimut szög. Az itt bemutatott RAP elrendezés nem alkalmas fázishelyes radiálisan és azimutálisan polarizált nyaláb előállítására, mert nem változtat a polarizáción csak irányokat választ ki. Egy kör apertúrájú, a körüljárás mentén változó vastagságú, úgynevezett fázislemezzel kiegészítve a rendszert, azonban előállítható hagyományos értelemben vett hengerszimmetrikus polarizáció [63].

A fenti eredmények alapján megállapítható, hogy s-típusú kettőtörő kristálylemezen átfókuszálva, radiálisan és azimutálisan polarizált nyaláb állítható elő, az ordinárius és extraordinárius fókuszok különválasztásával és felnagyításával [64]. A létrehozott, hengerszimmetrikus polarizációval rendelkező nyaláb intenzitáseloszlása akár 27%-kal kisebb kiterjedésű lehet a fókuszban, így használatával növelhető egy képalkotó eszköz feloldása [65].

4.3.3 Diffrakció limitált csík létrehozása és forgatása kettőtörő lemezzel

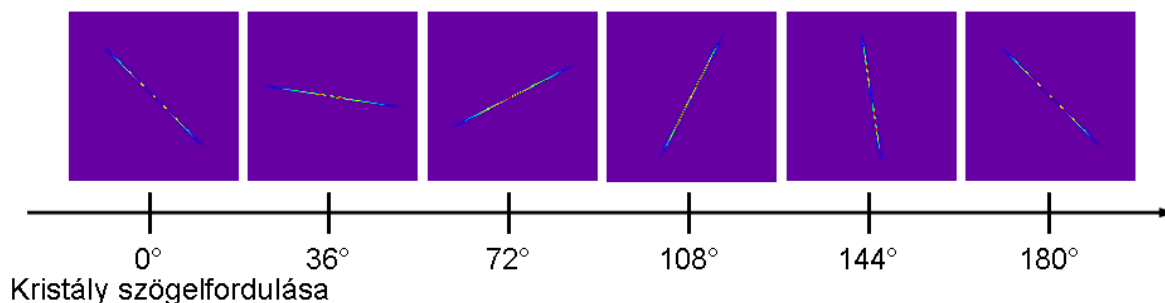
A korábban bemutatott reflexiós TOM elrendezés mechanikai pontosságának egyik korlátozó eleme a nyalábforgatásnál használt forgatóasztal szinkron és aszinkron hibája. Ezek következtében a forgástengely vertikális és horizontális pozíciója kissé kimozdul az optikai tengely által kijelölt origóból, így a felvett projekciók középpontja nem azonos. Ez a rekonstruált kép minőségének romlását eredményezi. A hiba kiküszöböléséhez olyan megoldásra lenne szükség, melynél az átmenő nyaláb pozíciója nem változik a forgatást végző optika laterális irányú elmozdulásával. Ilyen megoldás lehet, ha a mintát kivilágító csíkot egy kettőtörő kristályon átfókuszálva hozzuk létre. Ha a kristály tengelye merőleges a rendszer optikai tengelyére, azaz a kristály p-típusú, valamint a kivilágító nyaláb lineárisan poláros, akkor az extraordinárius fókusz szétválik. Az erős asztigmia miatt, az intenzitáseloszlások diffrakció limitált csíkok lesznek. A szeparáció nagyságának és a fókuszok alakjának vizsgálatához kiszámoltam egy 0,5mm kalcitkristályon, 0,45NA-jú objektívvel keresztülfókuszált, 532nm-es hullámhosszúságú és lineárisan polarizált nyaláb ordinárius és extraordinárius intenzitáseloszlását az optikai tengely mentén. Az eredmények a 71. ábrán láthatók.



71. ábra: Ordinárius és extraordinárius nyaláb intenzitáseloszlása a fókuszok környékén, lineárisan poláros beeső nyaláb és p-típusú kristály mellett.

Itt a kristály tengelye 45° -ot zárt be a beeső fény polarizációs irányával, így mindkét fókusz létrejött. Látható, hogy az asztigmia következtében felhasadt extraordinárius fókuszpár körülveszi a hengerszimmetriáját megőrző ordinárius fókuszt. Az eloszlások csúcshintéze a metszetek sarkában, fehér számmal van feltüntetve. A kettőtörő kristályt az optikai tengely körül forgatva az extraordinárius fókuszban lévő csíkok is forognak, mégpedig a kristály elfordulásával megegyező mértékben. A felhasadt fókusz kristálytól távolabbi felének számolt elfordulása látható a 72. ábrán. Az intenzitáseloszlás a csík mentén változik ugyan az elfordulás szögével, de ennek hatása a reflexiós TOM által rekonstruált képen utólag teljesen eltüntethető.

Extraordinárius fókusz:



72. ábra: Az extraordinárius fókusz kristálytól távolabbi intenzitáseloszlásának forgatása.

Ha a kristálylap kiterjedése elég nagy ahhoz, hogy a forgatómechanika hibája okozta laterális imbolygás során a nyaláb teljes egészében kivilágítsa, akkor az így megvalósított

nyalábforgatás nem csúsztatja el a felvett projekciókat. A módszer gyakorlati megvalósítása jelenleg folyamatban van.

5. Konklúzió

1. **Szimulációkkal megvizsgáltam a TOM által rekonstruált kép minőségének függését a projekciók számától és azok finomságától.** Megmutattam, hogy a projekciók finomításával a rekonstruált kép részletessége egy határon túl már nem növelhető. A projekciók számának növelésével együtt nő a rekonstruált kép kontrasztja [45],[46].
2. **Kísérlettel igazoltam, a TOM feloldóképessége transzmissziós üzemmódban, a minta forgatásával meghaladja a koherens fénnel kivilágított, hagyományos mikroszkópok feloldóképességét,** amennyiben a pásztázásra használt struktúra kisebb, mint az alkalmazott mikroszkóp objektív által még feloldható kritikus méret [45].
3. A gyorsabb pásztázás érdekében a rendszert nyalábpásztázási üzemmódra alakítottam át. A nyaláb forgatását és a pásztázási irány forgatását két különböző módon oldottam meg. **Mindkét esetben a forgató mechanika tengelyhibájának kiküszöbölésére egy olyan módszert dolgoztam ki, amely a hibából eredő képminőség romlás mértékét az elért feloldási határ alá csökkentette** [46].
4. **Kísérletileg megmutattam, hogy a reflexiós TOM feloldóképessége meghaladja a piacon kapható konfokális mikroszkóp feloldóképességet, azonos fókuszáló objektív használata mellett** [46].
5. **Kimutattam, hogy kettőstörő lemezen keresztül történő fókuszálásnál (a kristály tengelye merőleges az optikai tengelyre) az ordinárius és extraordinárius fókuszok nem gerjeszthetők szeparáltan lineárisan polarizált beeső nyalábbal, nagy NA esetén** [58]. A fókuszáló objektív elforgatja a polarizáció irányát az ideálistól, az apertúra negyedeinek szélén jelentősen. Az így létrejövő inhomogén kivilágítás miatt torzul a fókusz intenzitásprofilja és a sérült hengerszimmetria miatt aberrációk lépnek fel. A fókuszoltok szeparációja javítható katadioptrikus optika használatával. Ebben az esetben a kettőstörő plánparallel lemez vezet be aberrációt.

6. **Kettőstörő lemezen átfókuszálva radiálisan és azimutálisan polarizált nyalábot alítottam elő [64].** Ha az alkalmazott kristály tengelye merőleges a kristály felszínére, (s-típusú kristály) akkor a keletkező ordinárius és extraordinárius fókuszban a polarizáció azimutális és radiális szimmetriát mutat. OSLO sugárkövető programmal kiszámoltam, hogy lineárisan polarizált kivilágító nyaláb esetén a keletkező fókuszolt hengeres szimmetriája sérül, míg cirkulárisan poláros kivilágító nyalábot használva nem változik intenzitáseloszlás szimmetriája a fókuszban. A számolási eredményeket kísérlettel igazoltam. A keletkező azimutális és radiális fókuszok szeparációja a kettőstörő kristály vastagságától és anyagi tulajdonságától függ. (Fázishelyes, radiálisan polarizált nyaláb fókuszálhatósága jobb, mint a lineárisan vagy cirkulárisan poláros nyalábé, így optikai képalkotó rendszerben történő használatával nagyobb laterális feloldás érhető el.)

6. Summary

6.1. Introduction

Optical microscopy is an important technique for a vast number of applications in science and engineering. It is particularly important in life sciences as it allows one to investigate intact samples including living cells in the range from a few microns to several hundred nanometres. Its non-invasive imaging property provides advantages that are not found in other methods such as electron microscopy. To efficiently exploit these advantages, optical imaging systems and techniques with resolution beyond the wave optical limit (superresolution) are in the focus of a very intense research in modern microscopy.

One of the main parameters of an imaging system is its resolution, which is limited by the diffraction of light waves and the aberration of the applied optical elements. The aberration can be reduced by increasing the quality of the applied optical elements, and in ideal case one arrives at the resolution limit set by the diffraction. This limit can be described by the Rayleigh or Sparrow criteria. In case of optimal illumination in the visible spectral range, the minimum resolvable distance (critical distance) of an optical system is approximately the half of the applied wavelength, corresponding to about 200nm lateral and 400nm axial resolution. Improving this limit has been a source of continuing research of different methods with major successes such as confocal microscope, 4Pi microscope, multiphoton microscope, structured illumination, stimulated emission depletion (STED) microscope, localization microscopes (PALM, STORM), near field imaging and so on. Some of the abovementioned methods can reduce the critical distance with several percents whilst others provide around ten times higher resolution. However, most of these methods require fluorescent indicators or special samples with limited geometry and material properties. In case of non-linear techniques intensive illumination is needed, which can damage the biological samples (photobleaching).

In contrast to the conventional microscopes, several techniques aim to obtain detailed information from the inner structure of a sample. Techniques like confocal microscopy, total internal reflection fluorescent (TIRF) microscopy and optical projection tomography (OPT) acquire this information working in the optical spectral range. Confocal microscopy is one of the earliest methods developed for improved resolution along the optical axis. Filtering out the irrelevant intensity information coming outside from the investigated region of the sample, it provides $\sqrt{2}$ times larger axial resolution than conventional optical microscope. Confocal

imaging is achieved by point illumination and raster scanning of the entire image, which is a rather time consuming procedure. OPT practically applies the computer tomography (CT) technology in the optical wavelength range, where laser sources are used instead of x-rays. Both OPT and CT performs indirect imaging, where the absorption property of the sample is measured. In the simplest case the sample is illuminated through by collimated beams and the transmitted intensity is measured, meanwhile the light source and the detector are moved together along a line. The recorded transmission data as a function of the detector's position is called projection. Depending on the actual technical design of the system, the sample or the beam can be rotated. Projections – captured at different angular positions – compose the sinogram and the cross section image is reconstructed with a computer algorithm such as filtered back projection (FBP). In OPT the detected intensity by a CCD pixel is proportional to the integrated absorption of all the voxels through which the actual laser beam travels. There is a significant difference between CT and OPT. In the optical regime diffraction cannot be neglected and the laser beam cannot be considered as a straight ray, when longitudinal projections are acquired. Thus, OPT is limited by the depth of focus (DOF) of the optical system, which scales inversely with the square of the numerical aperture (NA). To achieve a sufficiently high DOF, the numerical aperture has to be kept at a relatively low value, which also decreases the spatial resolution. This fact indicates that the OPT is not suited to perform superresolution imaging. Moreover, the thickness of the applied sample is limited and the optical path difference depends on the angle of scanning in case of non-cylindrically symmetric sample.

In present dissertation a novel, indirect imaging technique that combines the principle of tomographic reconstruction with the arrangement of a line-scanning confocal microscope is studied comprehensively.

6.2. Objectives

My main aim was to build and study a novel, non-interferometric, microscopic device referred to as Tomographic Optical Microscope (TOM), which successfully combine the scanning arrangement of a line-scanning confocal microscope and the indirect imaging principle of tomographic reconstruction, providing enhanced lateral resolution. As a first step, I performed numerical simulations to investigate the accuracy of the applied reconstruction algorithm and determine the optimal value of the reconstruction parameters such as the number of projections and the step size of scanning. To demonstrate the resolution enhancement of TOM method, I designed and built two optical systems. The first arrangement measured the projections of the given sample in transmission mode, while the second acquired the reflected intensity data applying slit scanning confocal technique. The variation of the scanning direction was achieved by sample and beam rotation. Based on the recorded images of the arrangements, the resolution limit and imaging properties of TOM method were experimentally investigated.

A numerical code was developed to simulate the applied projection recording and reconstruction processes and make the adjustment of the second device easier. Both the preliminary measurements and the results of simulations showed that the quality of the reconstructed image strongly depends on the axial runout of the beam or sample rotating mechanism. To reduce the effect of this runout, an *in-situ* axial error correction technique was developed and tested.

Elimination of the introduced rotational error is possible by using an optical element, which can generate and rotate the illumination structure on the sample's surface and insensitive for the lateral misalignment of the rotation axis. The necessary optical element can be created applying a birefringent plane plate. Such a birefringent plate is able to change the polarization distribution of the illumination beam. In ideal case the properly polarized beam can be focused into a tighter spot or line, which can further improve the resolution of the imaging system. The feasibility of an optical element with the mentioned advantages was also investigated theoretically and experimentally.

6.3. Materials and methods

First the imaging capabilities of the proposed TOM arrangements had been studied numerically. I implemented the FBP reconstruction algorithm using MATLAB software environment, to optimize the parameters of the recorded sinograms. The sinogram recording process of TOM – both in transmission and reflection modes – were also modeled by an individually developed code. Distortions in the focused intensity distribution, the image degrading effect of the rotation error and the proposed correction procedure were also taken into account.

Two TOM arrangements were built to determine the available resolution enhancement. In transmission mode, a non-transparent edge was imaged on the surface of the sample. The position of the edge was shifted and the transmitted total intensity was measured behind the sample. The sinogram could be obtained by rotating the sample and repeating the measurement. The non-transparent edge was generated by a spatial light modulator (SLM). A reflective grid with different periods on a silica substrate was used as a test sample. To collect the transmitted intensity, a microscope objective ($M = 4$, $NA = 0.1$) was applied. With this objective the arrangement could be used as a coherently illuminated conventional microscope as well. The resolution limit of TOM and this conventional microscope was compared based on the recorded images.

In reflection mode, the illumination and scanning scheme of a line-scanning confocal microscope was applied. An adjustable slit was illuminated by a diode-pumped, frequency-doubled Nd:YAG laser. The produced cylindrical beam was focused on the sample by a cover-slide-corrected *Zeiss LD 'Plan-Neofluar'* microscope objective ($M = 20$, $NA = 0.4$). Since the back aperture of the objective was illuminated only by the zero order of the diffraction pattern of the slit, the intensity distribution in the focal plane was diffraction-limited. A galvo scanner was used for beam scanning and the scanning direction was changed by the rotation of a Pechan prism. An *in situ* correction method was developed to realign the deviated rotational axis – due to the rotational error – with the galvo scanner. The direct imaging performance of TOM arrangement was measured using a standard test pattern (*Richardson Test Slide, Bio-Microtech, US 2004/0227937 A1*). The recorded images were compared with the images of two commercially available point-scanning confocal devices (*Zeiss Axiovert 135M, Olympus Fluoview FV1000*) using the same microscope objective and sample.

To design a birefringent optical system, which is able to create the diffraction limited illumination and eliminate the effect of the rotational error in TOM, the commercially available ray tracing software, OSLO was used. Using OSLO, I was able to calculate the polarization maintaining efficiency of microscope objectives. The generated intensity and polarization conditions by focusing through a birefringent plane plate were also studied with the software. To verify these calculations, an optical arrangement was built and the intensity distribution in the focus was measured.

To design a birefringent optical system, which is able to create the diffraction limited illumination and eliminate the effect of the rotational error in TOM, the commercially available ray tracing software, OSLO was used. Using OSLO, I was able to calculate the polarization maintaining efficiency of microscope objectives. The generated intensity and polarization conditions by focusing through a birefringent plane parallel plate were also studied with the software. To verify these calculations, an optical arrangement was built and the intensity distribution in the focus was measured.

6.4. New scientific results

1. I investigated the influence of the reconstruction parameters of FBP on the quality of the TOM image. The results of my calculations showed that decreasing the step size of scanning (Δn) the finer details of the object can be resolved: however, a smaller step size increases the computational time proportionally to the square of the number of steps. Decreasing Δn beyond a certain limit, the resolution of the reconstructed image can not be increased further. With increasing the angular resolution of the sinogram ($\Delta\phi$) the contrast of the image improves. The values of Δn and $\Delta\phi$ determine the frequency resolution of the image in the Fourier or reciprocal space. Assuming that the object does not contain information above a certain frequency limit in the reciprocal space, Δn has to be at least as small as it is required by the Shannon sampling criteria. To obtain a reconstructed image completely free from artefacts, an infinite number of projections is necessary, which means that $\Delta\phi$ must converge to zero. [45][46]
2. I designed and built a TOM arrangement in transmission mode with sample rotation. I experimentally showed that its resolution exceeds the resolution of a conventional optical microscope with coherent illumination, using the same objective. Images of a reflecting equidistant grid with $4\mu\text{m}$ period were recorded by TOM and the optical microscope. The critical distance (CD), which is half of the minimum observable period, proved to be larger than $2\mu\text{m}$ in case of the optical microscope. In contrast, the resolution of TOM was better than this value. The NA of the applied objective was 0.1 and the wavelength of illumination was 660nm . The intensity modulation of the grid could not be observed in the CCD image of the optical microscope, but it was resolved in the reconstructed image of TOM. The Fourier spectrum of the recorded images was also compared and the characteristic frequency component belonging to the $2\mu\text{m}$ CD was resolved only by the TOM. [45]
3. To reduce the scanning time when a high number of projections are recorded, the arrangement was redesigned and rebuilt using line-scanning and reflection method. I applied two different methods to change the scanning direction, namely sample and beam rotation. In case of both solutions, the axial runout of the rotating mechanism seriously degraded the reconstructed image quality. The motion error is always present in a

mechanical rotation system and can be divided into two parts. The synchronous error, which is repeated round to round, can be measured separately from the image recording and corrected subsequently. To correct the randomly changing asynchronous error, an *in-situ* runout measurement and correction process is necessary. I developed such a method for sample rotation as well as for beam rotation. In case of sample rotation a lens was placed behind the sample and its focal point was aligned in the plane of the sample's front surface and next to the sample. As the scanning beam passed over the focal point the transmitted light was collected by the lens and an intensity peak was measured. This peak indicated a virtual axis of rotation in each scanning position. During the reconstruction, the recorded projections were realigned relative to this axis. The solution was similar when beam rotation was applied. A part of the illumination beam was coupled out and focused through a pinhole, which was declared the virtual axis. As the beam was rotated, the coupled out part of the beam missed to run through the pinhole due to the motion error. The deflected beam and the deflected axis of rotation were realigned with the line-scanning mechanism. Applying the abovementioned methods, I could reduce the effect of the synchronous and asynchronous motion error beyond the resolution limit of TOM. [46]

4. I demonstrated that resolution of the line-scanning TOM arrangement in reflection mode exceeds the resolution of a commercially available point-scanning confocal microscope, using the same microscope objective. First the intensity distribution of the illumination pupil was measured. Its full width at half maximum (FWHM) proved to be $0.664 \pm 0.014 \mu\text{m}$. This value is very close to the theoretical data ($0.5\lambda/\text{NA} = 0.665 \mu\text{m}$ where $\text{NA} = 0.4$, $\lambda = 532\text{nm}$). In the case of a point-scanning confocal microscope, the FWHM of the illumination pupil's PSF is $0.61\lambda/\text{NA}$, according to the theory. The PSF of a confocal system is the product of the PSF of the illumination and the PSF of the detection pupils. If we assume the same NA in the illumination and detection paths, the measured FWHM result indicates that the lateral resolution of TOM exceeds the resolution limit of a point-scanning confocal microscope. The resolution difference was demonstrated by recording images of the Richardson star sample with TOM and a point-scanning confocal device (*Zeiss Axiovert 135M*). According to the images, the CD of TOM was $0.443 \mu\text{m}$ ($\lambda = 532\text{nm}$) while the CD of the confocal microscope was $0.517 \mu\text{m}$ ($\lambda = 543\text{nm}$). Thus the resolution of TOM, even corrected for the wavelength, is 15% better than that of a confocal microscope. [46]

5. My aim was to design an optical element, containing a birefringent plane plate, which is able to create the diffraction limited illumination line and eliminate the effect of the rotational error. As a first step I investigated the possibility of independent generation of ordinary and extraordinary foci by linearly polarized incoming beams using uniaxial crystals whose optical axis is parallel to their surface. The results of my calculation of the polarization conditions and the overlap integral of a refractive and a catadioptric system showed an intensity loss of almost 10% when a high quality refractive imaging system was used. I showed that this intensity loss can be reduced to 2% by means of an appropriate catadioptric objective. The difference between the two systems is not only the sum of the intensity degradation, but also the level of degradation, which is greater at the edge of the four quarters of the beam behind the objective. At high numerical apertures the inhomogeneous illumination distorts the focus shape and the impaired cylindrical symmetry introduces optical aberrations. I have shown that the shape of the generated focus suffers serious distortion at high numerical apertures even if a catadioptric imaging system is used. [58]
6. It is known that a cylindrically polarized illumination beam can increase the resolution of an imaging system. To utilize this property I proposed and studied a special polarizer, which contains a birefringent plane parallel plate and transform the polarization of the incoming beam into radially and azimuthally polarized beams. This radial and azimuthal polarizer (RAP) was built and experimentally studied. The simulation results showed that by focusing through a birefringent plane parallel plate – the optical axis of which is perpendicular to its surface – two foci are generated. The ordinary and extraordinary foci are azimuthally and radially symmetric, respectively. I showed that the generated focus shape has an impaired cylindrical symmetry if a linearly polarized incident beam is applied. The introduced focus separation was demonstrated and studied experimentally. [64]

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, *Dr. Erdélyi Miklósnak* és *Prof. Dr. Szabó Gábornak*, hogy minden szakmai és kevésbé szakmai kérdésemre megfontolt és pontos választ adtak. Köszönöm, hogy közös munkánk során rendíthetetlen türelemmel próbálták meg átadni azt a tudományos szemléletmódot és szellemi eszköztárat melyre egy kutatónak feltétlen szüksége van.

Köszönöm *Dudás László* kollégámnak ösztönző támogatását, és kiváló érzékét gondolatfoslányaink eredményé kovácsolásához. Külön szeretném megköszöni a dolgozatban ismertetett tengelyhiba típusának, hatásának és megszüntetésének vizsgálatára irányuló, kitartó munkáját.

Köszönöm a Műszaki és Anyagtudományi Intézet munkatársainak, mindenekelőtt *Dr. Kokavec Jánosnak* és *Untener Kornélnak*, hogy az általuk adott feladatokkal szélesítették szakmai látóköröm.

Köszönöm a *Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékének* a kutatásaimhoz szükséges erőforrások megteremtését, valamint a *Furukawa Electric Technológiai Intézet kft.-nek*, hogy a Szegedi Tudományegyetemmel kötött együttműködésük keretében biztosították ösztöndíjamat és a munkámhoz szükséges eszközök jelentős részét. Köszönöm továbbá a *Carl Zeiss MicroImaging GmbH* és a *Trigon Electronica kft.* önzetlen támogatását, mely nélkül a kísérleti munkám biztosan megghiúsult volna.

Köszönöm családom tagjainak az elengedhetetlen biztatást, némelyiküknek pedig azt a többlettürelemet, mellyel a vállukra nehezedő, nem klasszikus mechanikai értelemben vett nyomást viselték, míg én a dolgozaton munkálkodtam.

PhD-tanulmányaim alatt csoportunk munkáját a következő pályázati források támogatták:

OTKA-NKTH CNK78549

OTKA T5049872

OTKA TS049872

Irodalomjegyzék

- [1] Garini Y., Vermolen B. J. and Young I. T., From micro to nano: recent advances in high-resolution microscopy, *Current Opinion in Biotechnology* **16** 3-12, (2005).
- [2] Betzig E., Patterson G. H., Sougrat R., Lindwasser O. W., Olenych S., Bonifacino J. S., Davidson M. W., Lippincott-Schwartz J., Hess H. F., Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution, *Science* **15** pp.:5793 (2006).
- [3] Rust J. M., Bates M and Zhuang X, Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), *Nature Methods* **3** pp.: 793 - 796 (2006).
- [4] MRC Human Genetics Unit, OPT homepage:
http://genex.hgu.mrc.ac.uk/OPT_Microscopy/optwebsite/frontpage/index.htm
- [5] Guenther R. D., Modern Optics, Chapter **10**, *John Wiley & Sons* 1990.
- [6] Novotny L. and Hect B., Principles of Nano-optics, Chapter **4**, *Cambridge University Press* 2006.
- [7] Born M. and Wolf E., Principles of Optics 7th, Chapter **8**, *Cambridge University Press* 2006.
- [8] Cheng P. C., Handbook of Biological Confocal Microscopy 3rd, *Pawley JB*, pp.: 189–90 2006.
- [9] Minsky M., Microscopy apparatus, **US Patent 3013467**, 1961.
- [10] Rector D. M., Ranken D. M., George J. S., High-performance confocal system for microscopic or endoscopic applications, *Methods* **30**(1) pp.: 16-27 (2003).
- [11] Dixon A. E., Damaskinos S., Atkinson M. R., A scanning confocal microscope for transmission and reflection imaging, *Nature* **351**(6327) pp.: 551-553 (1991).
- [12] Sheppard C. J. R., Shotton D. M., Confocal Laser Scanning Microscopy, *Springer-Verlag*, 1997.
- [13] Heintzmann R., Kreth G., Cremer C., Reconstruction of axial tomographic high resolution data from confocal fluorescence microscopy: a method for improving 3D FISH images, *Analytical Cellular Pathology* **20**(1) pp.: 7-15 (2000).
- [14] de Monvel J. B., Le Calvez S., Ulfendhal M., Image Restoration for Confocal Microscopy: Improving the Limits of Deconvolution, with Application to the Visualization of the Mammalian Hearing Organ, *Biophysical Journal* **80**(5) pp.: 2455-2470 (2001).
- [15] Cox G., Sheppard C. J. R., Practical limits of resolution in confocal and non-linear microscopy, *Microscopy Research and Technique* **63** pp.: 18-22 (2004).
- [16] Moerner W. E., Fromm D. P.: Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy, *Review of Scientific Instruments* **74**(8), pp.: 3597-3619 (2003).
- [17] Cox I. J., Sheppard C. J. R, Wilson T., Super-resolution by confocal fluorescent microscopy, *Optik* **60**(4) pp.: 391-396 (1982).
- [18] Betzig E., Trautman J. K., Near-Field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit, *Science* **257**(5067) pp.:189-195 (1992).
- [19] Hell S., Stelzer E. H. K., Properties of a 4pi confocal fluorescence microscope, *Journal of the Optical Society of America A*. **9**(12) pp.: 2159-2166 (1992).
- [20] Lindek S., Stelzer E. H. K., Resolution improvement by nonconfocal theta microscopy, *Optics Letters* **24**(21) pp.: 1505-1507 (1999).
- [21] Oheim M., Michael D. J., Geisbauer M., et al.: Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches, *Advanced Drug Delivery Reviews* **58**(7) pp.: 788-808 (2006).

- [22] Schermelleh L., Carlton P. M., Haase S., et al.: Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy, *Science* **320**(5881) pp.: 1332-1336 (2008).
- [23] Hell, S.W., et al., Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy, *Opt. Lett.* **19** pp.: 780-782 (1994).
- [24] Brooks R. A., Di Chiro G., Principles of Computer Assisted Tomography (CAT) in Radiographic and Radioisotopic Imaging, *Phys. Med. Biol.*, **21**(5) pp.: 689-732 (1976).
- [25] Sharpe J. A., Optical Projection Tomography, European Patent **EP1520173** (2006).
- [26] Sharpe J. A., Optical Projection Tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies, *Science* **296** pp.: 541-545 (2002).
- [27] Iizuka K. Engineering Optics, Second Edition, *Springer-Verlag*, 1987.
- [28] Kupsch A., Lange A., Hentschel M. P., Enhanced Spatial Resolution in 2D CT-Reconstruction without Filtered Back Projection: DIRECTT, *17th World Conference on Nondestructive Testing, Shanghai, China* (2008).
- [29] Lange A., Imaging method and device for the computer-assisted evaluation of computer-tomographic measurements by means of direct iterative reconstruction, USA Patent **US 2006233459** (2006).
- [30] Hecht E., Optics 4th, Chapter 3 (pp.: 69), *Addison Wesley*, 2002.
- [31] Saleh B. E. A., Teich M. C., Fundamentals of Photonics 2nd, *Wiley* 2007.
- [32] Betzig E., Isaacson M. and Lewis A., Collection mode near-field scanning optical microscopy, *Appl. Phys. Lett.* **51** pp.: 2088 (1987).
- [33] S. Quabis, R. Dorn, M. Eberler, O. Glöckl and G. Leuchs, Focusing light to a tighter spot, *Optics Communications* **179**(1-6) pp.: 1-7 (2000).
- [34] Iglesias I. and VohnsenSad B., Polarization structuring for focal volume shaping in high-resolution microscopy, *Optics Communications* **271** pp.: 40-47 (2007).
- [35] Zhan Q. and Leger J. R., Focus shaping using cylindrical vector beams, *Opt. Express* **10** pp.: 324-331 (2002).
- [36] Jia B, Gan X., and Gu M., Direct measurement of a radially polarized focused evanescent field facilitated by a single LCD, *Opt. Express* **13** pp.: 6821-6827 (2005).
- [37] Dorn R., Quabis S. and Leuchs G., SharperFocusfora RadiallyPolarized LightBeam, *Phys. Rev. Lett.* **91** (2003).
- [38] Tidwell S. C., Kim G. H., Kimura W. D., Efficient radially polarized laser-beam generation with a double interferometer, *Applied Optics* **32** pp.: 5222-5229 (1993).
- [39] Oron R., Blit S., Davidson N., Friesem A. A., Bomzon Z., Hasman E., The formation of laser beams with pure azimuthal or radial polarization, *Applied Physics Letters* **77** pp.: 3322-3324 (2000).
- [40] Cooper I. J., Roy M., Sheppard C. J. R., Focusing of pseudoradial polarized beams, *Optics Express* **13** pp.: 1066-1071 (2005).
- [41] Stadler M., Schadt M., Linearly polarized light with axial symmetry generated by liquid-crystal polarization converters *Optics Letters* **21** (1996).
- [42] Shoham A., Vander R. and Lipson S. G., Production of radially and azimuthally polarized polychromatic beams, *Opt. Lett.* **31** (2006).
- [43] Tervo J., Turunen J., Generation of vectorial propagation-invariant fields by polarization-grating axicons, *Optics Communications* **192** pp.: 13-18 (2001).
- [44] Schafer F. P., Method and device for polarizing light radiation, USA Patent **US 4,755,027** (1988).
- [45] Szabó G., Erdélyi M., Gajdáty G., Dudás L., Optical microscope system and method carried out therewith for reconstructing an image of an object, Patent Application **WO/2009/030966** (2009).

- [46] Gajdáty G., Dudás L., Erdélyi M., Szabó G., Line-scanning tomographic optical microscope with isotropic transfer function, *Journal of Optics* **12**(11) 115505 (2010).
- [47] Richardson Test Slide, Bio-Microtech, **US 2004/0227937 A1** (2004).
- [48] Aerotech Engineering reference:
<http://www.aerotech.com/products/engref/runout.html>
- [49] D. L. Sullivan, Alignment of rotational prisms, *Applied Optics* **11** pp.: 2028-2032 (1972).
- [50] A. Macgregor, Beam profiling: know your beam:
<http://www.laserfocusworld.com/articles/255504>
- [51] Hain M., Glöckner R., Bhattacharya S., Dias D., Stankovic S., Tschudi T., Fast switching liquid crystal lenses for a dual focus digital versatile disc pickup, *Optics Communications* **188** pp.: 291-299 (2001).
- [52] Kikuda H., Iwata K., First-order aberration of a double-focus lens made of a uniaxial crystal, *J. Opt. Soc. Am. A* **9** pp.: 814-819 (1992).
- [53] Liu X., Cai X., Chang S., and Grover C. P., Cemented doublet lens with an extended focal length, *Opt. Express* **13**, pp.: 552-557 (2005).
- [54] Park J. H., Jung S., Choi H., and Lee B., Integral imaging with multiple image planes using a uniaxial crystal plate, *Opt. Express* **11** pp.: 1862-1875 (2003).
- [55] Erdélyi M., Bereznai M., Gajdáty G., Bor Zs., Three-dimensional focus manipulation by means of a birefringent plate, *Optics Communications* **281** pp.: 4807-4811 (2008).
- [56] Wahlstrom E. E., Optical crystallography 5th Edition, *John Wiley and Sons* 1979.
- [57] OSLO Optics Software, Program Reference, Release 6.3, *Lambda Research Corp.*
- [58] Gajdáty G., Erdélyi M., Analysis of focus distortion based on birefringence, *Journal of Optics A* **9** pp.: 982-987 (2007).
- [59] Optical Society of America, Handbook of Optics, pp.: 10, *McGraw-Hill* 2001.
- [60] Inrad Inc.:
<http://www.inrad.com>
- [61] U-Oplaz Technologies Inc.:
<http://www.u-oplaz.com/crystals/crystals07.htm>
- [62] CVI Melles Girot Inc.:
<http://www.cvilaser.com>
- [63] József Sinkó, Fókuszpont intenzitás-eloszlásának manipulációja kettőstörő lemezzel, *szakdolgozat*, SZTE TTiK, 2009.
- [64] Erdélyi M., Gajdáty G., Radial and azimuthal polarizer by means of a birefringent plate, *Journal of Optics A* **10** (2008).
- [65] Sheppard C. J. R. and A. Choudhury, Annular pupils, radial polarization, and superresolution, *Applied Optics* **43** pp.: 4322-4327 (2004).